(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4486257号
(P4486257)

(45)発行日　平成22年6月23日(2010.6.23)　(24)登録日　平成22年4月2日(2010.4.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 17/02	(2006.01)	C07K	17/02	
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	A
A61K 39/12	(2006.01)	A61K	39/00	H
A61P 29/00	(2006.01)	A61K	39/12	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	29/00	

請求項の数 10　(全 40 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-577627 (P2000-577627)
(86)(22)出願日　平成11年10月20日 (1999.10.20)
(65)公表番号　特表2002-528393 (P2002-528393A)
(43)公表日　平成14年9月3日 (2002.9.3)
(86)国際出願番号　PCT/US1999/024548
(87)国際公開番号　WO2000/023955
(87)国際公開日　平成12年4月27日 (2000.4.27)
審査請求日　平成18年10月17日 (2006.10.17)
(31)優先権主張番号　60/105,132
(32)優先日　平成10年10月21日 (1998.10.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502006782
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８５２，ロックヴィル，エグゼキュティブ・ブールバード　６０１１，スイート　３２５，ナショナル　インスティチューツ・オブ・ヘルス，オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
(74)代理人　100089244
弁理士　遠山　勉
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】自己抗体の誘導のためのウイルス様粒子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
　乳頭腫ウイルスＬ１キャプシドタンパク質の対称的な集合を含むキャプソマー構造体と、
　前記キャプソマー構造体に結合して、寛容原を提示するウイルス様粒子（ＶＬＰ）を形成するように、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）及びＣＣＲ５から選択される寛容原の少なくとも１種類のＢ細胞エピトープを含む組成物であって、
　前記寛容原を提示するＶＬＰは、前記寛容原を規則的、反復的なアレイとして表示することを特徴とする、寛容原に対する免疫応答を刺激するための組成物。
【請求項２】
　前記キャプソマー構造体は２０面体であることを特徴とする請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
　前記寛容原は前記支持体にリンカーにより結合されていることを特徴とする請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
　前記リンカーはビオチンを含むことを特徴とする請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
　免疫系の細胞に結合した請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物を含む単離された複合体。
【請求項６】

10

20

請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物を含む製薬。
【請求項７】
ＨＩＶ感染を阻害するための請求項６に記載の製薬。
【請求項８】
炎症を抑制するための請求項６に記載の製薬。
【請求項９】
慢性ウイルス性疾患を治療するための請求項６に記載の製薬。
【請求項１０】
寛容原に対するモノクローナル抗体を生成する方法であって、
請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物を与えられた対象からのＢ細胞を用いてハイブリドーマを作成するステップを含むことを特徴とする方法。　10
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、Ｂ細胞免疫反応をインビボで刺激するための組成物および方法に関するものである。キメラのまたは複合体のウイルス様粒子を含む新規な生物学的手段、治療、および予防、ならびに人間の疾病の研究、治療、および防止のための、前記のものの使用方法が提供される。
【０００２】
［発明の背景］　20
人間の疾病の様々な段階で宿主免疫防御が効果を示していることは、充分確立されている。例えばウイルス感染中には、過去の免疫に反応して刺激された抗体が、感受性標的細胞の付着および浸透の前に、侵入してくるウイルスを中和することができる。この細胞が感染し始め、ウイルス関連抗原をその表面に展示すると、細胞性免疫反応もまた活性化され得る。この後者の場合、細胞毒性Ｔ細胞は、感染した細胞を殺し、それにより感染の進行を制限することができる。これらの液性および細胞性免疫反応は一般に、ＤＮＡまたはＲＮＡゲノムおよびタンパク質キャプシドまたは膜エンベロープより成る外殻を有するウイルスを包含する、多岐にわたるウイルスによる感染に対して開始される。
【０００３】
動物が、自分自身の組織の構成成分に対して同様に反応することなく殆どの外来抗原に対して激しい免疫反応を開始し得るという事実は、ＢｕｒｎｅｔおよびＦｅｎｎｅｒ（Ｔｈｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ｍａｃｍｉｌｌａｎ　Ｃｏ．、メルボルン（１９４９））に、免疫系は自己と非自己とを識別する何らかのメカニズムを発達させてきたに違いないということを示唆した。自己寛容の状態は、疑いなく、免疫系が通常暴露される中心抗原のために存在する（Ｓｉｓｋｉｎｄ，Ｇ．、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ編、Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク、Ｃｈ．２０（１９８４））。「中心抗原」とは、免疫系の細胞に通常暴露される自己抗原であり、一方「末梢抗原」とは、例えば物理的疎隔によって、通常、免疫系の細胞との接触から隔てられている自己抗原である。例えば眼、脳および精巣のある構成成分に対する反応を免疫系が開始できないのは、自己寛容ではなく、これらの組織が宿主の免疫系から隔絶していることに起因する。事実、自己免疫反応は、これらの末梢組織抗原を免疫監視機構から分離して維持している物理的「障壁」が無防備となる時に起こり得る。驚くべき事に脊椎動物のゲノムは自己抗原に対する抗体を産生するのに必要な情報を全て所有しており、数多くの自己抗原に対して自然に産生される抗体を常套的に検出することができる。しかしながらこれらの抗体は力価が低く、アビディティが低く、そしてＩｇＭクラスのものである。　30 40
【０００４】
幾人かの研究者は、自己寛容は、誕生時前後に、成熟前に起こる事象である、自己と非自己成分との識別を免疫系が「学習する」こと、を含んでいると考えている。例えば胎児の発達中にリンパ系が自己抗原に暴露されることは、自己抗原に対する寛容を発達させる上　50

で重要な相であると推測されている。別のモデルによれば、自己抗原に特異的な細胞表面レセプターを発現するリンパ球は、排除され、活性化不能とされ、またはその抗原に対して「寛容化」される。

【０００５】

「Ｂ細胞寛容」という語は、免疫系が抗原（例えば自己抗原）の存在に対して効果的に反応しない状態、より詳細には、免疫系のＢ細胞が抗原に対する反応を開始できない状態の描写にしばしば使用される。したがって、Ｂ細胞に正常に暴露されても高力価の抗体反応を誘導できない抗原、またはＢ細胞による正常な無反応に関係している抗原（例えば自己抗原）は、免疫系がその存在を「寛容している」ため、「寛容原」と称する。明らかに、自己抗原は寛容原であるが、外来抗原もまた、Ｂ細胞がその抗原に充分反応できない場合には寛容原となり得る。幾人かの研究者は、例えば慢性ウイルス感染（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）の担体である母親から生まれた新生児におけるウイルスの存続）は、免疫系がウイルス抗原に対して寛容化されたために起こると考えている（Ｔａｋａｓｈｉｍａ等、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、７５：３９８（１９９２））。寛容原は必ずしも分子全体である必要はなく、或る分子の免疫上重要な領域である可能性のある、一部分（例えばタンパク質のペプチドフラグメント）であってよい。研究者等は様々な技術によって動物における寛容の誘導に成功しているが、寛容原に対する抗体を産生させる方法についての本発明者等の理解は、新生児期に関するものである。

【０００６】

［発明の概要］

本発明者等は、通常自然に産生される力価または常套的ワクチン接種後の力価よりも、寛容原（自己抗原および外来抗原）に対する抗体の力価を増大させる組成物および方法を発見した。幾つかの態様では、規則正しく集合したサブユニットを有する、または寛容原の少なくとも１個のＢ細胞エピトープ（ここで寛容原は、規則的、反復的なアレイで提示される）に結合したキャプシドタンパク質を有する支持体またはキャプソマー構造体を使用して、Ｂ細胞寛容の破壊(break)は行われる。本発明の幾つかの態様では、寛容原およびウイルスキャプシドタンパク質は、異なる生物、ウイルス、または感染体から誘導される。支持体は、ビーズ、脂質膜、またはタンパク質ポリマーとすることができる。キャプソマー構造体は、二十面体のまたはらせんの対称性を有することができる。しかしながら望ましい組成物では、キャプソマー構造体は、自己集合して「ウイルス様粒子」またはＶＬＰと呼ばれる機能的な構造体を形成する、ウイルスキャプシドタンパク質で構成されている。

【０００７】

幾つかの態様においては、このウイルスキャプシドタンパク質はハイブリッド分子であるか、またはその他の点で修飾されている。したがって、幾つかの態様は「キメラウイルス様粒子（ＶＬＰ）」であり、別の態様は「複合体ウイルス様粒子（ＶＬＰ）」である［ここで「キメラＶＬＰ」は、遺伝子工学（例えば寛容原／キャプシドタンパク質融合物の作成）によってウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）に結合した寛容原を有し、そして「複合体ＶＬＰ」は、キャプシドタンパク質または寛容原またはその両者の化学的、物理的またはその他の修飾によってウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）に結合した寛容原を有する（例えばビオチン／ストレプトアビジン、ビオチン／アビジン、その他のリガンド／レセプターアレイ）］。したがって、本発明の態様は、サブユニットの規則的な集合を有する支持体と、寛容原を与える免疫原を形成するように前記支持体に結合した寛容原の少なくとも１個のＢ細胞エピトープとを含む組成物［ここで、この寛容原を与える免疫原は、前記寛容原を規則的、反復的なアレイに提示する］を包含する。本発明に係る別の組成物は、キャプシドタンパク質の対称的な集合体を有するキャプソマー構造体と、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）を与える寛容原を形成するよう前記キャプソマー構造体に結合した寛容原の少なくとも１個のＢ細胞エピトープとを含む［ここで、寛容原を提示するＶＬＰは、寛容原を規則的、反復的なアレイに提示する］。本発明に係る別の態様は、免疫系の細胞に結合したこれらの組成物の一つを含む単離された複合体に

関するものである。さらに、これらの組成物を含む医薬は本発明の態様である。

【０００８】

寛容原に対する抗体を産生させる方法もまた本発明の一部である。一つの方法では、寛容原に対する抗体を必要とする対象を特定し、そしてその対象に、寛容原に対する抗体を産生させるように、上記の組成物のうちの一つを十分量供給することによって、寛容原に対する抗体を産生させる。別のアプローチは、自己抗体を産生する物質の特定を含む。したがって、上記の組成物のうちの一つを対象に提供し、その対象から抗体を単離し、工程（ｂ）で単離された寛容原に結合する抗体の力価を決定し、そして高力価の抗体を産生する能力によって当該物質を特定する。さらに、寛容原に対するモノクローナル抗体を産生する方法もまた本発明の範囲内にある。このアプローチによっては、上記組成物のうち一つを対象に提供し、この対象から、Ｂ細胞とのハイブリドーマを作成する。別の方法は、対象において低力価の抗体反応を生成する抗原を選択し、この抗原を修飾ＶＬＰに結合させて複合体ＶＬＰを形成させ［ここで、この複合体ＶＬＰは、抗原を規則的、反復的なアレイに提示する］、そしてこの複合体ＶＬＰを対象に提供し、それにより高力価の抗体を産生させるという工程を含む、通常免疫原性の化合物に対する抗体の産生を増強する方法を包含する。

［発明の詳細な説明］

【０００９】

本明細書に記載の発明は、自己抗原および外来抗原を包含する「寛容原」に対する抗体の力価を、日常的に自然に生成する、または常套的ワクチン接種法の後の力価よりも増加させる組成物および方法に関するものである。「低力価抗体反応」とは、生理学的に有効なインビボ免疫反応を開始する抗体を不充分な量で産生するＢ細胞反応を意味し、一方「高力価抗体反応」とは、生理学的に有効なインビボ免疫反応を開始する充分量の抗体を指す。「低力価抗体反応」および「高力価抗体反応」という語はさらに、産生される抗体の濃度およびアビディティに従って定義される。即ち、ある抗原が「低力価抗体反応」を生むか「高力価抗体反応」を生むかは、ＥＬＩＳＡ検定において抗原がもはや検出され得ない抗体含有血清の希釈度に依存するものである［ここで、典型的には、標的抗原２００ｎｇが１：１０００希釈の二次抗体と共に使用される］。したがって、「低力価抗体反応」は、典型的には上記のＥＬＩＳＡの条件の下で約１：１００００希釈未満であり、そして「高力価抗体反応」は、典型的には１：１００００希釈に等しいかまたはこれより大きい。「寛容原」という語は、本明細書全体を通して使用され、完全なＢ細胞の非反応性、または、その抗原が抗原の正常なインビボ活性に実質的な影響を及ぼさない低力価の抗体反応のみを誘導するという点で限定されたＢ細胞の反応性、を伴っている自己抗原または外来抗原（ペプチド、核酸、炭水化物、または脂質）を指す。

【００１０】

幾つかの態様では、Ｂ細胞寛容の破壊は、規則正しく集合したサブユニットを有する、または寛容原の少なくとも１個のＢ細胞エピトープ（ここで寛容原は、規則的、反復的アレイに提示されている）に結合したキャプシドタンパク質を有する支持体またはキャプソマー構造体を使用して行われる。本発明の幾つかの態様では、寛容原およびウイルスキャプシドタンパク質は、異なる生物、ウイルス、または感染体から誘導される。支持体は、ビーズ、脂質膜、またはタンパク質ポリマーとすることができる。キャプソマー構造体は、二十面体またはらせん対称性を有することができる。しかしながら好ましい組成物では、キャプソマー構造体は、自己集合して機能的な構造体を形成する、ウイルスキャプシドタンパク質で構成されている。このようなウイルスキャプシド集合体を「ウイルス様粒子」またはＶＬＰと称する。

【００１１】

幾つかの態様においては、このウイルスキャプシドタンパク質はハイブリッド分子であるか、またはその他の点で修飾されている。「ウイルス様粒子」または「キャプソマー構造体」という語はしばしば、ウイルスゲノムを包含しない、キャプシドタンパク質の自己集合的な規則的なアレイを含む機能的な構造体を指すのに使用される。この点において、幾

つかの態様は「キメラウイルス様粒子（ＶＬＰ）」であり、別の態様は「ウイルス様粒子（ＶＬＰ）」である。「キメラＶＬＰ」という語は、寛容原が、遺伝子工学（例えば寛容原／キャプシドタンパク質融合物の作成）によってウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）に結合しているＶＬＰを指す。したがって、寛容原／キャプシドタンパク質融合物は、ウイルス外殻タンパク質が寛容原のＢ細胞エピトープ由来のアミノ酸配列とキメラを作っていることから、しばしば「ハイブリッド外殻タンパク質」と呼ばれる。本明細書中で使用する命名法によれば、ハイブリッド外殻タンパク質は、そのウイルス外殻タンパク質の名称およびウイルス外殻タンパク質に関連して示される寛容原の由来によって特定される。「複合体ＶＬＰ」という語は、キャプシドタンパク質または寛容原またはその両者の化学的、物理的またはその他の修飾によって寛容原がウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）に結合しているＶＬＰ（例えばビオチン／ストレプトアビジン、ビオチン／アビジン、その他のリガンド／レセプターアレイ）を呼称するのに使用する。

【００１２】

ハイブリッド外殻タンパク質は、例えば寛容原のアミノ酸配列をウイルス外殻タンパク質のアミノ酸配列中に挿入することによって、または、ウイルス外殻タンパク質のアミノ酸配列を寛容原のアミノ酸配列に置換することによって、その一次構造体内部に寛容原のアミノ酸配列を取り込むことができる。キメラ形成の部位は多くの場合、ＶＬＰの外表面および自己集合に関与するウイルス外殻タンパク質の領域に依存する。この部位は例えばウイルス中和(neutralizing)エピトープの部位に対応し得る。ハイブリッド外殻タンパク質は、本発明のある態様では単一外殻タンパク質、別の態様ではキャプソマー（五量体に配置された５個の外殻タンパク質）、または好ましい態様では、粒子構造体として配置された多キャプシドタンパク質より成るＶＬＰの形態をとり得ることが理解されるべきである。

【００１３】

ＶＬＰのキャプソマー構造体を含むウイルスキャプシドタンパク質は多くの異なるタイプのウイルス由来であってよいが、望ましい態様は、二十面体構造体（例えばＴ＝７）を有するウイルス、およびその天然供給源の宿主が哺乳動物であるウイルス、およびパピローマウイルス亜科、ポリオーマウイルス亜科、またはパルボウイルス科のファミリーより選ばれるウイルス中に見出されるタンパク質を有する。好ましい組成物は、多数のパピローマウイルス複合体または修飾されたＬ１タンパク質を含むキャプシド集合体を有する。

【００１４】

本明細書に開示されるキメラのおよび複合体のＶＬＰ技術を使用することにより、幾つかのアプローチを使用して寛容原を支持体に結合させ、数多くの新規な組成物を作り出すことができる。殆どの態様では、その組成物は、１個以上の寛容原分子が支持体に結合している点で「多量体の」支持体である。しかしながら幾つかの態様においては、その組成物の寛容原部分が、一列に融合された同じ寛容原ドメインを多数含んでいるという点で「多量体化された」支持体が提供される。さらに、多量体化された寛容原を有する多量体組成物もまた本発明の態様である。別の態様では、その組成物は、１個以上のタイプの寛容原が提示されているという点で「複合物」支持体である。当業者は、複合物支持体は多量体であってよく、そして多量体化された寛容原を含んでいてよいということをも理解できるであろう。好ましくは、多量体組成物、多量体化された組成物、および複合物組成物ならびにそれらの組み合わせは、細胞への免疫系の発現を最適化するような方法で支持体に寛容原を結合させる。例えばこの態様は、寛容原を、規則的な、間隔の狭い、反復的なアレイに提示する。さらに、幾つかの態様は、支持体およびウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）の間、または寛容原およびウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）の間、またはその両方で作り替えられ、その結果、立体障害を減らし、最適な免疫反応を促進するリンカーを包含する。したがって、幾つかの組成物は、リンカーによってその支持体に結合しているウイルスキャプシドタンパク質（またはその相同体）または寛容原またはその両者を有する。

【００１５】
多くの異なる寛容原を、ペプチド、核酸、炭水化物、および脂質を包含する支持体に結合させることができる。幾つかの態様においては寛容原は自己抗原である。例えば、寛容原は、リガンド、例えば新生物形成性細胞の表面上のタンパク質、または成長因子、例えば血管新生に関連するタンパク質、またはウイルスレセプター、例えばケモカインレセプターＣＣＲ５、およびサイトカイン、例えばＴＮＦ－αであってよい。これらの「全長」寛容原のフラグメントもまた幾つかの態様にとって望ましい。即ち、幾つかの態様においては、寛容原は分子全体（例えば全長）であってよいが、大抵は、寛容原は全長分子の一部またはフラグメントのみを含む（例えば部分長）。望ましい寛容原は、全長分子のうち少なくとも５ないし５００、有利なものとして５ないし２００、そして好ましくは５ないし５０の連続するアミノ酸を含んでいる。好ましくは、寛容原およびウイルスキャプシドタンパク質は、異なる生物、ウイルス、または感染体から誘導される。別の態様は、免疫系の細胞（例えばＢ細胞、Ｔ細胞、または樹状細胞）に結合させた上記組成物のうち一つを含む、単離された複合体、および上記の組成物のうち一つを含む医薬を包含する。

【００１６】
本発明に係る組成物、単離された複合体、および医薬は、Ｂ細胞寛容の研究、自己抗体を産生する物質の同定、および人間の疾病、例えばウイルス感染、慢性炎症、および癌の治療および予防のための、生物学的手段、治療薬、および予防薬として使用される。例えば一つの態様において、自己抗体を産生する物質を同定する方法が提供される。このアプローチでは、本発明に係る組成物を対象に供給し、次にこの対象から抗体を単離し、そして、単離されたこの抗体がその組成物により提示された寛容原と相互作用するかどうかの決定を行う。その後、単離された抗体が寛容原と相互作用する能力によってＢ細胞寛容を破壊するものとして、免疫原を同定する。別の態様では、寛容原に対する抗体を産生する方法が提供されるが、この場合、寛容原に対する抗体を必要とする対象を特定し、次いで治療上有益な量の本発明に係る組成物を供給する。加えて、ＨＩＶ感染、慢性ウイルス感染、癌および炎症の治療および防止の方法が提供され、これは、本発明に係る組成物を含む医薬を提供する工程を含むものである。例えば、乳癌および慢性関節リウマチは、それぞれＥｒｂＢ－２およびＴＮＦ－αに対する抗体の産生を誘導することにより治療することができる（Ｍａｉｎｉ，Ｒ．Ｎ．等、Ｉｍｍ．Ｒｅｖｉｅｗｓ、１４４：１９５－２２３（１９９５）；Ｂａｓｅｌｇａ，Ｊ．等、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１４：７３７－４４（１９９６））。さらに、本発明に係るキメラおよび複合体ＶＬＰ上のエピトープに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体が、態様である。

【００１７】
本発明者等の発見の証拠は、下に述べる二つの群の実験で提供される。第一の例示的説明では、マウスケモカインレセプター（ｍＣＣＲ５）中心抗原に対するＢ細胞寛容を、ｍＣＣＲ５寛容原を有するキメラＶＬＰでマウスを免疫することによって解除した。これらの実験では、マウスケモカインレセプターＣＣＲ５の細胞外ループを表すペプチドを、常套的クローニング技術により牛パピローマウイルスＬ１外殻タンパク質（ＢＰＶ－１）の中和エピトープ中に組み入れた。Ｌ１は、たとえアジュバントが無くても高レベルの中和抗体を誘導するウイルス様粒子（ＶＬＰ）へと自己集合する固有能力を持っている（Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ，Ｒ．等、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ、８９：１２１８０－１２１８４（１９９２）；Ｇｒｅｅｎｓｔｏｎｅ，Ｈ．Ｌ．等、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５：１８００－１８０５（１９９８））。ＣＣＲ５レセプターは、メモリーＴ細胞およびマクロファージを包含する数多くの細胞型および組織で発現される（Ｚｈａｎｇ，Ｌ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７２：５０３５－５０４５（１９９８））。「Ｌ１－ＣＣＲ５」と呼ばれる組み換えにより生成されたキメラタンパク質は、キャプソマーの規則的なアレイを有する粒子構造体（以後、ウイルス様粒子またはＶＬＰと称する）へと自己集合し、これが免疫原として使用された。ＣＣＲ５はＨＩＶのＭ親和性株のための共同レセプターであることが知られており、そしてヒトＣＣＲ５に対するモノクローナル抗体はインビボでヒト細胞のＨＩＶ感染をブロックするということを

当業者は理解できるであろう。
【００１８】
下記に詳述するように、Ｌ１－ＣＣＲ５免疫原を投与されたマウスは、天然由来のマウスＣＣＲ５に結合し、ランテス（ＲＡＮＴＥＳ）リガンドの結合を阻害し、そしてヒトーマウスＣＣＲ５キメラを発現する指標セルラインのＨＩＶ－１感染をブロックする、自己抗体を産生した。本発明者はさらに、マウスにおけるこの治療プロトコルの長期的な影響は最小限であることを示す。さらに、本発明者等は、ＣＣＲ５に対する自己抗体が霊長類で産生できることを立証した。これらの実験は、免疫系と同時に起こった細胞表面自己抗原に対するＢ細胞寛容を破壊することができることの証拠を提供するものである。これらの新規な組成物は医薬に配合することができ、ＨＩＶ感染を治療および／または防止するために使用できる。
【００１９】
第２群の実験において、本発明者等は、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）のフラグメントを含む複合体ＶＬＰを対象に接種することにより、ＴＮＦ－αに対する自己抗体の産生を誘導できることの証拠を提供する。この免疫原は、ストレプトアビジン／ＴＮＦ－α融合タンパク質（ＳＡ－ＴＮＦ－α）をビオチニル化(biotinylated)Ｌ１－ＶＬＰに結合させることにより作り出した。ＳＡ－ＴＮＦ－α　ＶＬＰ複合体を接種したマウスは、ＴＮＦ－α感受性セルライン（Ｌ９２９細胞）に及ぼすＴＮＦ－αの影響を中和する自己抗体を産生した。これらの新規な組成物は医薬に配合することができ、慢性炎症性疾患および、慢性関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、癌、多発性硬化症、糖尿病、乾癬、骨粗鬆症、および喘息を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）ＴＮＦ－αの過剰な放出に関連するその他の疾患、の治療および／または防止に使用することができる。下記の内容およびそれに続く実施例において、本発明者等はこれら二つの群の実験例をより詳細に述べる。
【００２０】
免疫寛容を破壊しＨＩＶ感染を阻害するキメラＶＬＰ
自己抗原に対する自己抗体を誘導できるか否かを研究している間に、本発明者等は、ウイルス粒子の規則的な表面に類似する状況にその抗原を置くことによってＢ細胞寛容が解除され得ることを発見した。最初の実験で、本発明者等はマウスケモカインレセプターｍＣＣＲ５を牛パピローマウイルスＬ１外殻タンパク質の主要な免疫部位に挿入した。この組み換えタンパク質は「Ｌ１－ＣＣＲ５」と呼ばれ、ＣＣＲ５エピトープをコードしているアミノ酸を多数含む自己集合性キメラＬ１タンパク質である。パピローマウイルスは高度に特異的な免疫原であるため、これが選択された。各々の脊椎動物種を、各群が幾つかのパピローマウイルスの型を含んでいる、別個の群のパピローマウイルスに感染させた。あるパピローマウイルスの型のビリオンに対する中和抗体は、通常、別の型に対する免疫を付与しない。
【００２１】
パピローマウイルスは、多岐にわたる動物種の上皮において複製し、良性の上皮および繊維上皮性腫瘍または疣贅の形成を引き起こす、エンベロープを持たないウイルスの例である。パピローマウイルス粒子は直径が約５５ｎｍであり、ヌクレオヒストン核に入ったおよそ８ｋｂの二本鎖ＤＮＡゲノムを包んでいる（Ｂａｋｅｒ等、Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｊ．、６０：１４４５（１９９１））。キャプシドは、ウイルスによりコードされている二つのタンパク質、Ｌ１およびＬ２で構成され、これらはＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上でそれぞれおよそ５５ｋＤａおよび７５ｋＤａに移動する（Ｍｏｓｅ　Ｌａｒｓｏｎ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６１：３５９６（１９８７））。主たるＬ１キャプシドタンパク質は、Ｔ－７二十面体対称性と関連する７２の五量体に配置されている。ビリオン当たりおよそ１２個のＬ２キャプシドタンパク質がある（Ｂａｋｅｒ等、Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｊ．、６０：１４４５（１９９１））。
【００２２】
Ｌ１タンパク質は自己集合（会合）する能力を持っており、その結果、様々な組み換え発

現系においてＬ１タンパク質を所定のパピローマウイルスから発現させることによって、大量のウイルス様粒子（ＶＬＰ）を生成することができる（Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ等、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：１２１８０（１９９２）（ＢＰＶ－１、バキュロウイルス発現系）；Ｈａｇｅｎｓｅｅ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６７：３１５（１９９３）（ＨＰＶ－１、ワクシニアウイルス発現系）；Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６７：６９２９（１９９３）（ＨＰＶ－１６、バキュロウイルス発現系）；Ｒｏｓｅ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６７：１９３６（１９９３）（ＨＰＶ－１１、バキュロウイルス発現系）；Ｓａｓａｇａｗａ等、Ｖｉｒｏｌ．、２０６：１２６（１９９５）（ＨＰＶ－１６、酵母発現系）；Ｎａｒｄｉｎｅｌｌｉ－Ｈａｅｆｌｉｇｅｒ等、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、６５：３３２８（１９９７）（ＨＰＶ－１６、細菌発現系））。集合に必要である訳ではないが、細胞でＬ１と同時発現させる（Ｌ１／Ｌ２　ＶＬＰ）際にはＬ２をＶＬＰ中に組み入れる。

【００２３】

変性させたＬ１タンパク質ではなく天然由来のビリオンまたはＬ１　ＶＬＰでウサギを免疫すると、高力価の中和血清抗体が誘導される（Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ、６４：３１５１（１９９０）；Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ等、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：１２１８０（１９９２）；Ｐｉｌａｃｉｎｓｋｉ等、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２：３５６（１９８４）；Ｓｅｇｒｅ等、Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．、１６：５１７（１９５５））。天然粒子に対して産生されたポリクローナルおよびモノクローナル中和抗体は、コンホメーションの上で依存性のエピトープを認識する（Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ等、Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．、２８：１９５（１９９３）；Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ等、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、１８１：５７２（１９９１））。パピローマウイルス抗原に対する液性免疫反応の性質は充分確立されているが、Ｌ１　ＶＬＰの規則的な結合構造を活用して免疫系に対する寛容原を、強力な免疫反応を推進し、ひいてはＢ細胞寛容を破壊するようなやり方で提示できるとは、誰も認識または予想していなかった。

【００２４】

キメラＬ１－ＣＣＲ５粒子の生成は、Ｌ１が粒子を形成する能力を損なわないような、Ｌ１の領域へのＣＣＲ５ペプチドの挿入を必要とした（実施例１を参照）。殆どのＬ１アミノ酸の正確な構造的位置および機能は知られていないものの、キャプシドの集合に影響を及ぼすことなしに様々なヒトパピローマウイルスの中和エピトープを損なうアミノ酸変化が、Ｌ１の３個の非接触的領域にマッピングされている（Ｌｕｄｍｅｒｅｒ，Ｓ．Ｗ．、Ｂｅｎｉｎｃａｓａ，Ｄ．およびＭａｒｋ　ＩＩＩ，Ｇ．Ｅ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０：４７９１－４７９４（１９９６）；Ｌｕｄｍｅｒｅｒ，Ｓ．Ｗ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１：３８３４－３８３９（１９９７）；Ｒｏｄｅｎ，Ｒ．Ｂ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１：６２４７－６２５２（１９９７））。これらの部位のアミノ酸がキャプシドの表面にありそうであったため、ＢＰＶ－１　Ｌ１中の類似の部位をペプチド挿入の標的とした。よって、ＢＰＶ－１　Ｌ１アミノ酸の１３０－１３６、２７５－２８５、または３４４－３５０位のＬ１配列を、Ｃ５７ＢＩ／６（Ｂ６）マウス由来のマウスＣＣＲ５（ｍＣＣＲ５）の第一ＥＣループに対応する１６アミノ酸のペプチドをコードしていると予想される配列に置換した、３個のＬ１－ＣＣＲ５キメラを組み立てた。これらのキメラはそれぞれＬ１－ＣＣＲ５キメラ１、２、および３と命名された。

【００２５】

Ｌ１－ＣＣＲ５キメラを含む組み換えバキュロウイルスを作成し、得られたＬ１－ＣＣＲ５粒子を勾配遠沈によって精製した（Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ，Ｒ．等、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：１２１８０－１２１８４（１９９２））。このキメラＬ１－ＣＣＲ５分子がＶＬＰ、キャプソマー、またはその他の粒子形に集合されるか否かを決定するため、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ　６ゲル濾過クロマトグラフィーを３個のＬ１－ＣＣＲ５キメラの調製物について実施した（実施例２を参照）。Ｌ１　ＣＣＲ５キメラ１の調製物のみが、集合した粒子構造を示す画分に溶出した。故に、以後の分析はこのキメラ

に限定した。電子顕微鏡によるキメラ１粒子の調査は、野生型Ｌ１　ＶＬＰより小さな（およそ２８ｎｍ：５５ｎｍ）多くの粒子を示した。形態学的には、このＬ１－ＣＣＲ５キメラ粒子はポリオーマウイルス１２ＩＣＯＳＡ殻（Ｔ－１粒子）に似ており、このＩＣＯＳＡ殻は、ポリオーマウイルスの主たる外殻タンパク質ＶＰ１の１２の五量体キャプソマーの規則的アレイで構成され、高イオン強度においてＶＰ１キャプソマーのインビトロ再集合の際に生成され得る（Ｓａｌｕｎｋｅ，Ｄ．、Ｃａｓｐａｒ，Ｄ．Ｌ．Ｄ．およびＧａｒｃｅａ，Ｒ．Ｌ．、Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ、５６：８８７－９００（１９８９））。このＬ１－ＣＣＲ５粒子と類似の大きさの小粒子は、野生型ＢＰＶ－１　Ｌ１　ＶＬＰ調製物の少量成分としてしばしば見出される。

【００２６】

ＣＣＲ５キメラ粒子が抗ＣＣＲ５抗体を誘導できるかどうかを調べるため、Ｃ５７Ｂ１／６マウス（挿入配列と同一のＣＣＲ５配列をコードしている系統）を、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子、変性されたＬ１－ＣＣＲ５タンパク質、または野生型ＶＬＰでワクチン接種した（実施例３を参照）。これらのマウスからの血清を、ＣＣＲ５ペプチドおよび野生型ＶＬＰに対する反応性についてＥＬＩＳＡによって試験した（図１Ａ）。野生型ＶＬＰを接種した対照マウス由来の血清は抗ＣＣＲ５　ＥＬＩＳＡ反応性を有していなかったが、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子の接種は、抗ＣＣＲ５　ＥＬＩＳＡの高力価を有する血清を誘導した。これらの力価は、フロイントアジュバントと組み合わせて接種した３匹の動物では３ｘ１０^{3}ないし３ｘ１０^{4}の範囲であり、アジュバント無しで接種した２匹の動物では３ｘ１０^{3}と測定された。対照的に、アジュバントと組み合わせて変性Ｌ１－ＣＣＲ５粒子を接種したマウスでは、ＣＣＲ５ペプチド特異的抗体は検出されなかった。変性された材料は高い力価の抗Ｌ１抗体を導いたことから、変性Ｌ１－ＣＣＲ５粒子の反応性の欠如はＣＣＲ５ペプチドに限定されていた（図１Ｂ）。

【００２７】

これらの結果は、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子がＣＣＲ５ペプチドに対する抗体を導き出すという事の証拠を提供したが、これらの抗体が、膜関連ｍＣＣＲ５の一部としての天然由来のコンホメーションのこのペプチドを認識していない可能性が存在した。この可能性を排除するため、細胞上のｍＣＣＲ５に結合する抗ＣＣＲ５抗体の能力をフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）分析により試験する実験を実施した（実施例４を参照）。一次マウスＴ細胞およびマクロファージ上に発現されるｍＣＣＲ５に対するＬ１－ＣＣＲ５粒子血清の結合は、これらの細胞に対する高レベルの非特異的マウスＩｇＧ結合のため、評価できなかった。これに代わり、Ｂ６マウス由来のクローニングされたｍＣＣＲ５をトランスフェクションによりＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞で一時的に発現させ、精製したマウスＩｇＧの結合を、ベクターによりトランスフェクトした細胞と比較して測定した（図２Ａ－２Ｇ）。この検定により、Ｌ１－ＣＣＲ５で免疫したマウス由来のＩｇＧはｍＣＣＲ５でトランスフェクトした細胞と特異的に結合し（図２Ａ）、一方、野生型ＢＰＶ　ＶＬＰ血清由来の精製ＩｇＧとは（図２Ｂ）、またはヒト（ｈ）ＣＣＲ５の第２ＥＣループに結合するモノクローナル抗体（ｍＡＢ１８２）とは（図２Ｃ）、有意な結合が無かった。抗体の特異性についての対照として、マウスに、スカシガイヘモシアニン（ＫＬＨ）と結合させたｍＣＣＲ５ペプチドを接種した。これらのマウスは抗ＣＣＲ５ペプチド抗体反応を生成し、牛血清アルブミン（ＢＳＡ）と結合させたＣＣＲ５ペプチドに対して１０^{5}のＥＬＩＳＡ力価であったが、これらのマウスの血清から精製されたＩｇＧは、ｍＣＣＲ５発現細胞と結合しなかった（図２Ｄ）。したがって、Ｌ１－ＣＣＲ５により誘導された抗体は、ＫＬＨと結合したペプチドにより誘導された抗体とは対照的に、これらが天然ｍＣＣＲ５と結合するという点で、真の自己抗体として機能する。

【００２８】

　この抗体が天然のｍＣＣＲ５と結合する能力を調べるためのもう一つのアプローチとして、本発明者等は、Ｌ１－ＣＣＲ５血清が、ｍＣＣＲ５で一時的にトランスフェクトさせたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞との結合についてｍＣＣＲ５のケモカインリガンドと競合できるかどうかを調べた（図３）（実施例５を参照）。マウスケモカインＭＩＰ－１α、ＭＩ

Ｐ－１β、およびランテス（ＲＡＮＴＥＳ）はｍＣＣＲ５のリガンドである。さらに、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳのヒト相同体はｍＣＣＲ５と結合することができる（Ｍｅｙｅｒ，Ａ．等、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７１：１４４４５－１４４５１（１９９６）；Ｎｉｂｂｓ，Ｒ．Ｊ．Ｂ．等、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２：１２４９５－１２５０４（１９９７））。この競合検定では、市販品を入手できるヨウ素化ヒトＲＡＮＴＥＳを使用した。１：３０希釈のＬ１－ＣＣＲ５血清が、１：３０希釈の野生型Ｌ１　ＶＬＰ血清を用いた３７％置換と比較して、およそ６６％のヨウ素化ヒトＲＡＮＴＥＳに取って代わった（１００倍過剰のコールドＲＡＮＴＥＳを用いて観察される置換に類似する）。１：７５および１：１５０希釈のＬ１－ＣＣＲ５血清はそれぞれ２５％および１７％のヨウ素化ＲＡＮＴＥＳに取って代わり、一方、これらの希釈での対照血清を使用した場合は有意な置換は観察されなかった。先の研究は、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、およびＲＡＮＴＥＳはｈＣＣＲ５の第２ＥＣループに結合することを示した。何故ならこれらの結合はこのループに対するモノクローナル抗体によってブロックされたがｈＣＣＲ５のアミノ末端に対する抗体によってはブロックされなかったためである（Ｗｕ，Ｌ等、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８６：１３７３－１３８１（１９９７））。これらの実験結果は、これら二つの部位の間に位置するｍＣＣＲ５の第一ＥＣループと結合する抗体は、恐らくはこのループが第２ＥＣループの近位にあるため、ＲＡＮＴＥＳの結合を部分的にブロックできることの証拠を提供している。

【００２９】

Ｌ１－ＣＣＲ５により誘導された抗体がＭ親和性ＨＩＶ－１感染をブロックする能力もまた試験した（実施例６を参照）。ＨＩＶ－１エンベロープとｈＣＣＲ５との相互作用は複雑であり、系統依存性であると思われ、恐らくはＣＣＲ５の幾つかのＥＣ領域を含んでいる。とりわけモノクローナル抗体研究はｈＣＣＲ５の第２ＥＣループおよびNH_2末端領域を巻き込み、そしてキメラレセプターの研究は、ｈＣＣＲ５の第一および第三ＥＣループもまた、ＨＩＶ－１との相互作用に貢献していることを示した（Ｗｕ，Ｌ．等、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８６：１３７３－１３８１（１９９７）；Ｒｕｃｋｅｒ，Ｊ．等、Ｃｅｌｌ、８７：４３７－４４６（１９９６）；Ａｔｃｈｉｓｏｎ，Ｒ．Ｅ．等、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７４：１９２４－１９２６（１９９６）；Ａｌｋｈａｔｉｂ，Ｇ．等、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７２：１９７７１－１９７７６（１９９７）；Ｐｉｃａｒｄ，Ｌ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１：５００３－５０１１（１９９７）；Ｒｏｓｓ，Ｔ．Ｍ．、Ｂｉｅｎｉａｓｚ，Ｐ．Ｄ．およびＣｕｌｌｅｎ，Ｂ．Ｒ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７２：１９１８－１９２４（１９９８））。ｍＣＣＲ５はＨＩＶ－１共同レセプターとしては機能しないが、ｈＣＣＲ５のバックグラウンドにｍＣＣＲ５の第一ＥＣループ（Ｂ６マウス配列）を持っているヒトーマウスキメラレセプター（ＨＭＨＨ）は、ヒトセルラインで発現される時、共同レセプターの活性（低い効率ではあるが）を有している（Ｋｕｈｍａｎｎ，Ｓ．Ｅ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１：８６４２－８６５６（１９９７））。本発明者等はこのキメラレセプターを使用して、Ｌ１－ＣＣＲ５血清がＭ親和性ＨＩＶ－１感染をブロックできるかどうかを試験した。Ｌ１－ＣＣＲ５血清から精製されたＩｇＧがＨＭＨＨと結合することを確認するため、ＨＭＨＨで一時的にトランスフェクトさせたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞上でＦＡＣＳ分析を実施した。Ｌ１－ＣＣＲ５マウス由来のＩｇＧ、およびヒトＣＣＲ５の第２ＥＣループと結合する正の対照モノクローナル抗体では正の結合が得られ、一方、野生型Ｌ１　ＶＬＰマウス由来のＩｇＧはＨＭＨＨと結合しなかった（図２Ｅ－２Ｇ）。

【００３０】

これらの結果に基づき、Ｌ１－ＣＣＲ５マウス由来の血清を、ＨＩＶ－１のＭ親和性ＢａＬ株の感染を阻害する能力について、単一複製サイクル検定で、ＭＡＧＩインディケーターセルラインを用いて試験した（Ｋｉｍｐｔｏｎ，Ｊ．およびＥｍｅｒｍａｎ，Ｍ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６６：２２３２－２２３９（１９９２））。ＨＭＨＨで一時的にトランスフェクトしたインディケーター細胞をＬ１－ＣＣＲ５血清の存在下にＨＩＶ－１　ＢａＬに感染させた時、１：１５、１：３０、および１：７５の希釈はそれぞれ感染性の６５

％、５０％、および４５％中和を示した（図４）。同じ希釈において、野生型Ｌ１　ＶＬＰマウス由来の対照血清は幾らかの非特異的中和を示したが、これは１：１５希釈で２５％、１：３０および１：７５で１５％に過ぎなかった。比較のために、正の対照として使用した、ｈＣＣＲ５結合モノクローナル抗体（ｍＡＢ１８２）（１μｇ／μＬの始発濃度）希釈液存在下でＨＩＶ－１　ＢａＬに感染させたインディケーター細胞は、同様の中和曲線を示した（図５）。Ｌ１－ＣＣＲ５血清はさらにＴ細胞親和性単離物ＨＩＶ－１　ＬＡＩに対する中和活性について試験したが、予想通りこの単離物に対してはバックグラウンドレベルを超える中和を示すことはなかった。

【００３１】

自己抗体の誘導についての一つの懸念は、このような方法が、ことによると天然ＣＣＲ５タンパク質からの制御不能の抗原刺激を包含する、免疫された動物にとって有害な長期的帰結を有するのではないかということである。しかしながら、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子接種後６ヶ月間にわたり監視された３匹のマウスでは、この期間全体で２ないし８倍のＣＣＲ５特異的抗体力価の低下を認め、この減少は、Ｌ１特異的抗体の力価の減少にほぼ対応するものであった。動物のうち２匹は抗ＣＣＲ５抗体力価に２倍の低下を、そして抗Ｌ１抗体力価に３倍の低下を示した。三匹目の動物は抗ＣＣＲ５力価に８倍の低下を、そして抗Ｌ１抗体力価に１０倍の低下を示した。これらの結果は、天然由来のＣＣＲ５への連続的暴露が連続的なＢ細胞誘導を導くわけではないという事の証拠を示しており、これは恐らく、細胞のタンパク質が免疫系により無視される状況にあり続け、そしてそれ以上に、抗ＣＣＲ５反応がＬ１－ＣＣＲ５粒子上のＣＣＲ５ペプチドへの暴露に専ら依存しているためであろう。免疫されたマウスは対照マウスと同じ体重を維持し、最終ブースティングの６ヶ月後に実施されたこのマウスのうち２匹の剖検は、視認できる病理学的変化を示さなかった。

【００３２】

人間においてＣＣＲ５は専らメモリーＴ細胞（ＣＤ３$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ２６^{hi}）上に発現される。加えて、胸腺、脾臓およびリンパ節のマクロファージの１ないし１０％がＣＣＲ５を発現する（Ｚｈａｎｇ，Ｌ．等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７２：５０３５－５０４５（１９９８））。脾臓、胸腺、および末梢血由来のマウス単核細胞のＦＡＣＳ分析は、ＣＣＲ５を発現する脾臓または末梢血マクロファージおよびＴ細胞サブセットに、対照マウスと比較した時の低下がないことを示した。したがって、本発明者等の分析によれば、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子で免疫されたマウスは、この観察期間で視認できる病理学的変化を受けなかった。

【００３３】

人間のＢ細胞寛容を破壊するための、そして特にＨＩＶ感染の治療および防止のための、キメラＶＬＰの使用の有益性を支持するさらなる証拠が、マカークＣＣＲ５ポリペプチドに対する自己抗体を産生させる霊長類の研究から得られた（実施例７を参照）。これらの実験においては、マカークＬ１－ＣＣＲ５融合タンパク質をコードしている組換え発現構造体が作成された。本発明者等は、対抗するヒト／マカークＣＣＲ５ペプチド（これらは同じである）を、マウスの実験で使用したのと同一のＬ１主要キャプシドタンパク質中の位置にクローニングした。次に、キャプシド粒子の自己集合性を評価した。マウスＬ１－ＣＣＲ５についての先の実験と比較する時、キメラマカークＬ１－ＣＣＲ５での粒子形成は効率の悪いものであった。それにも拘わらず、本発明者等はブタオザルの免疫に充分な粒子を精製することができた。Ｔｉｔｅｒ　Ｍａｘアジュバントの存在下にこの調製物で３回ワクチン接種した５匹の動物中４匹は、ＥＬＩＳＡ検定で測定したところ明らかにＣＣＲ５特異的抗体を産生した（図５）。本発明者等は、ＶＬＰ表面に外来ペプチドを展示し、かつ、より自己集合に適合したＣＣＲ５ペプチドの挿入のための別の部位を発見することにより、ヒト／マカークＣＣＲ５に対する自己抗体を産生するためのより良いＶＬＰに基づく免疫原を生成することができると信ずるものである。さらに、下記のように本発明者等は、ヒト／マカークＣＣＲ５寛容原を有する複合体ＶＬＰは、より良い免疫反応を誘導するであろうと考えている。

【００３４】
第一群の実験の結果は、中心抗原ｍＣＣＲ５のＥＣ部分由来のペプチドをパピローマウイルス粒子の規則的な配列中に組み込み、その後これらの粒子を免疫すると、レセプターに結合しリガンドおよびＨＩＶ－１結合をブロックする自己抗体を誘導することができるということを立証している。ｍＣＣＲ５に対する自己抗体は、Ｌ１特異的抗体の減少と同様の速度で時間と共に減少するが、これは、内因性細胞表面ＣＣＲ５によるＢ細胞刺激が誘導されなかったことを示唆するものである。
【００３５】
Ｌ１－ＣＣＲ５粒子により誘導された抗自己抗体は、細胞表面に発現されたｍＣＣＲ５と効率的に結合するが、これは、これらが真の自己抗体として機能していることを示している。対照的に、ＫＬＨと結合させたＣＣＲ５ペプチドにより誘導された抗体は、天然ｍＣＣＲ５と結合できなかった。結合している自己抗体は単にこの特定のアミノ酸配列を認識している訳ではなく、その天然由来のコンホメーションの寛容原アレイを認識しているようである。しかも、Ｌ１－ＣＣＲ５で免疫したマウス由来のＩｇＧはＣＣＲ５リガンドの結合をブロックし、そのマウスＣＣＲ５ペプチドを含むキメラＣＣＲ５タンパク質を介してＨＩＶ－１感染を阻害するが、この事はさらに、これらの自己抗体の特異性および本発明の態様の治療的有用性を証明するものである。これらの検定で観察された阻害は、矛盾のないものであり、再現性があり、特異的であり、そしてヒトＣＣＲ５の第２ＥＣループに対する対照モノクローナル抗体に類似するものである。
【００３６】
ｍＣＣＲ５の第一ＥＣループを最初の研究用に選択した。何故ならこれによって、Ｂ細胞寛容の破壊に対する本発明者等のアプローチを試験し、そして対象の身体がＨＩＶ－１感染を阻害することを誘導する新規な方法を提供することが同時に可能になるためである。不活性ＣＣＲ５アレルについてヘテロ接合であるＨＩＶ－１に感染した人間は、たとえＣＣＲ５発現の部分的な縮小が臨床上有意な効果を有し得るにせよ、ＡＩＤＳへの進行を遅らせる（Ｌｉｕ，Ｒ．等、Ｃｅｌｌ、８６：３６７－７７（１９９６）；Ｓａｍｓｏｎ，Ｍ．等、Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）、３８２：７２２－５（１９９６）；Ｗｉｎｋｌｅｒ，Ｃ．等、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７９：３８９－９３（１９９８））。本発明者等の結果はまた、抗原が適当な免疫原において提示されたならば、霊長類はＣＣＲ５に特異的な抗体を産生する能力を有することを証明している。
【００３７】
本発明者等は、初回の接種から６ヶ月間の経過観察を行ったマウスにおいて、自己抗体の誘導による有害な影響が無いことを観察した。自己反応性Ｔ細胞についての試験は実施していないが、本発明者等はＣＣＲ５に対するＴ細胞寛容を破壊するとは予想しなかった。中心自己抗原を認識するＴ細胞は、免疫系の発達過程で強力に選択される。恐らくは、抗ＣＣＲ５　ＩｇＧを産生するための免疫グロブリンクラスの変換に必要なＴ細胞の援助は、連鎖したウイルスタンパク質に対するものなのであろう。逆に、大人の動物においては、ＲＡＧ再活性化およびＢ細胞レセプター遺伝子の末梢編集の結果、新たな特異性を有する抗体が絶えず産生される（Ｈａｎ，Ｓ．等、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７８：３０１－５（１９９８）；Ｐａｐａｖａｓｉｌｉｏｕ，Ｆ．等、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７８：２９８－３０１（１９９８）；Ｈｅｒｔｚ，Ｍ．等、Ｎａｔｕｒｅ、３９４：２９２－５（１９９８））。
【００３８】
免疫寛容を破壊しＴＮＦ－α活性を阻害する複合体ＶＬＰ
Ｂ細胞寛容を破壊する本発明者等の第二のアプローチは、前もって生成したＶＬＰの外表面に寛容原を付けることによって組み立てられた、複合体ＶＬＰの使用を含むものである。いったん集合されると、ＶＬＰおよびキャプソマー構造体はかなり安定であり、大きなまたは小さな寛容原の付加は容易に達成できる。自己集合の不安定性のため寛容原の大きさが通常小さいキメラＶＬＰアプローチとは対照的に、複合体ＶＬＰのアプローチは、大きな寛容原をＶＬＰに集合することを可能にし、この事が、より多くの抗体エピトープを

提供し、ひいてはより多様な自己抗体の組を提供することとなる。この計画は、主たるキャプシドタンパク質中への配列の遺伝的挿入よりも多様な配列や大きさのポリペプチドにも適用することができるであろう。

【００３９】

複合体ＶＬＰを使用した第一の実験では、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用によって寛容原ＴＮＦ－αをＶＬＰに結合させた。Ｌ１　ＶＬＰは、露出したリジン残基をビオチニル化するスルホ－ＮＨＳ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いてしっかりとビオチン化されることが示された。飽和条件の下では、このビオチニル化ＶＬＰは、Ｌ１分子１個当たりおよそ３個のストレプトアビジン四量体の比率でストレプトアビジンに結合した。この結果は、ストレプトアビジン／寛容原融合タンパク質が、稠密な、規則正しい、そしてきっちりと圧縮された配列のエピトープとして免疫系に与えることができるという証拠を提供する。

【００４０】

　したがって、本発明者等はＥ．ｃｏｌｉにおいて、マウスＴＮＦ－αの２０アミノ酸長フラグメントに連結したストレプトアビジン核を含む融合タンパク質を作成した（ＳＡ－ＴＮＦ－αと称する）。この融合タンパク質を不溶性封入体として精製し、グアニジン－ＨＣｌ中に可溶化し、そして生理緩衝液中への透析によって再折り畳みを行った。次いでこの再折り畳みされた融合タンパク質を、上記のように製造したビオチニル化Ｌ１　ＶＬＰと結合させ、ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ免疫原を作り上げた。ＳＡ－ＴＮＦ－α融合タンパク質は高い占有性でビオチニル化ＶＬＰに結合した（図６）。次に、ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ免疫原をマウスに注射して自己抗体反応を誘起した。複合体ＶＬＰをマウスに２回注射すると（３ｘ５ｇ）、天然のマウスＴＮＦ－αに結合する高力価（ＥＬＩＳＡによる）の抗体が誘導された（第１表を参照）。対照的に、ＳＡ－ＴＮＦ－αのみまたはＶＬＰのみによる免疫は、確実なまたは高い自己抗体反応を誘起できなかった（第２および３表を参照）。３回目のＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰの注射後には、ＴＮＦ－α抗体の力価は全てのマウスで$１０^{５}$に達した。

【００４１】

【表１】

第１表

ビオチニル化ＶＬＰに結合させたＳＡ－ＴＮＦαタンパク質で２回免疫した後のマウスの力価

ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ					
＋アジュバント			－アジュバント		
$１０^{４}$	$１０^{４}$	$１０^{４}$	４０	１６０	１６０

【００４２】

【表２】

第２表

ＳＡ－ＴＮＦαタンパク質のみで２回免疫した後のマウスの力価

ＳＡ－ＴＮＦα					
＋アジュバント			－アジュバント		
$１０^{２}$	<１０	<１０	１０	<１０	<１０

【００４３】

【表３】

第３表

ＳＡ－ＴＮＦαタンパク質のみで２回免疫した後のマウスの力価

ＶＬＰｓ					
＋アジュバント			－アジュバント		
<１０	<１０	<１０			

10

【００４４】

　これらの結果は、ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ免疫原がＢ細胞寛容を効果的に破壊することを確立した。複合体ＶＬＰがＢ細胞寛容を効果的に破壊するというさらなる証拠が、ＴＮＦ－α細胞毒性検定から得られた。これらの実験において、ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ免疫原がインディケーターセルライン（Ｌ９２９細胞）のＴＮＦ－α仲介アポトーシスを防止する能力が決定された。ストレプトアビジン結合ＶＬＰ（対照）またはＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰのいずれかを接種したマウスから得られた血清をＴＮＦ－αと共にインキュベートし、血清処理されたまたは血清処理されていないＴＮＦ－α試料を培養中の細胞に添加した。血清がＴＮＦ－α活性を中和する能力を、生存細胞のパーセンテージの増加によって測定した。ＳＡ－ＴＮＦ－α／ＶＬＰ（５％溶液）を接種したマウス由来の血清は、生存細胞についてバックグラウンドレベルを３倍増加させた（図７）。マウスＴＮＦ－α融合タンパク質での有望な結果を得て、本発明者等はマカークＣＣＲ５の４個の細胞外ドメインの各々について同様のストレプトアビジン融合タンパク質を作成した。全ての４つの融合タンパク質はＥ．ｃｏｌｉの封入体から作成し精製した。４つのうち３つを、それらがビオチニル化ＶＬＰと強固に結合するよう再折り畳みすることができた。

20

【００４５】

　上記の論考および以下の実施例に示すように、寛容原に対応するペプチド配列は、集合されたキメラまたは複合体ウイルスキャプソマーの高度に機能的な配列の状況で提示される時、天然タンパク質に対するＢ細胞寛容を排除することができる。本明細書に記載の方法を用いてＢ細胞寛容を排除する能力は、数多くの適用を有している。例えば、この技術を使用してマウス抗自己モノクローナル抗体を作成することができる。さらに、このアプローチは、実験的動物モデルの正常または疾病プロセスにおけるその機能を調べるために可溶性タンパク質の活性を調節する手段として有効である。その上、自己抗体の誘導は、例えばそれぞれＥｒｂＢ－２およびＴＮＦ－αに対する抗体による乳癌および慢性関節リウマチの治療において、人間の疾病のためのモノクローナル抗体療法に代わる有効な代替療法を提供する（Ｍａｉｎｉ等、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．、１４４：１９５（１９９５）；Ｂａｓｅｌｇａ等、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１４：７３７（１９９６））。以下の議論は本発明の態様に関するさらなる特徴を記載するものである。

30

【００４６】

支持体およびキャプソマー構造体

40

ウイルス様粒子またはキャプソマー構造体は免疫系に自己ペプチドを到達させて自己抗体の産生を刺激するための好ましい系を表すが、本発明者等はさらに、本発明が、寛容原を、規則的な間隔の密な反復的アレイに提示することのできる、別の構造的集合体を包含することをも意図している。これらの支持体は、サブユニットの規則的な集まりであって、寛容原の少なくとも１個のＢ細胞エピトープを規則的な反復的アレイで支持体に結合させることができる。好ましくはこの支持体およびキャプソマー構造体は、抗原を、約１０－５００オングストローム、有利な間隔として約５０－３００オングストローム、そして好ましくは約１００オングストロームの間隔で提示することができる。即ち、提示された抗原分子間の間隔は、10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21，22 ，23，24，25，26，27，28，29，30，31，32，33，34，35，36，37，38，39，40，41，42，43，44，4

50

5，46，47，48，49，50，51，52，53，54，55，56，57，58，59，60，61，62，63，64，6
5，66，67，68，69，70，71，72，73，74，75，76，77，78，79，80，81，82，83，84，8
5，86，87，88，89，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99，100，101，102，103，1
04，105，106，107，108，109，110，111，112，113，114，115，116，117，118，119，1
20，121，122，123，124，125，126，127，128，129，130，131，132，133，134，135，1
36，137，138，139，140，141，142，143，144，145，146，147，148，149，150，151，1
52，153，154，155，156，157，158，159，160,160，161，162，163，164，165，166，16
7，168，169，170，171，172，173，174，175，176，177，178，179，180，181，182，18
3，184，185，186，187，188，189，190，191，192，193，194，195，196，197，198，19
0，191，192，193，194，195，196，197，198，199，200，201，202，203，204，205，20
6，207，208，209，210，211，212，213，214，215，216，217，218，219，220，221，22
2 ，223，224，225，226，227，228，229，230，231，232，233，234，235，236，237，2
38，239，240，241，242，243，244，245，246，247，248，249，250，251，252，253，2
54，255，256，257，258，259，260，261，262，263，264，265，266，267，268，269，2
70，271，272，273，274，275，276，277，278，279，280，281，282，283，284，285，2
86，287，288，289，290，291，292，293，294，295，296，297，298，299，300，301，3
02，303，304，305，306，307，308，309，310，311，312，313，314，315，316，317，3
18，319，320，321，322 ，323，324，325，326，327，328，329，330，331，332，333，
334，335，336，337，338，339，340，341，342，343，344，345，346，347，348，349，
350，351，352，353，354，355，356，357，358，359，360，361，362，363，364，365，
366，367，368，369，370，371，372，373，374，375，376，377，378，379，380，381，
382，383，384，385，386，387，388，389，390，391，392，393，394，395，396，397，
398，399，400，401，402，403，404，405，406，407，408，409，410，411，412，413，
414，415，416，417，418，419，420，421，422 ，423，424，425，426，427，428，429，
430，431，432，433，434，435，436，437，438，439，440，441，442，443，444，445，
446，447，448，449，450，451，452，453，454，455，456，457，458，459，460，461，
462，463，464，465，466，467，468，469，470，471，472，473，474，475，476，477，
478，479，480，481，482，483，484，485，486，487，488，489，490，491，492，493，
494，495，496，497，498，499，500オングストロームに等しく、またはこれより大きくすることができる。修飾されたＴ依存性２型抗原（ＴＩ－２）は、この点でＶＬＰと同様に挙動し得る。これらは、肺炎球菌多糖類、サルモネラポリマー化フラゲリン、デキストランおよびハプテン複合体フィコール（ポリスクロース）を包含する。

【００４７】

本明細書に示した例示的説明ではパピローマウイルスのウイルス様粒子を使用してきたが、自己抗体の産生の刺激における使用のためには、他のパピローマウイルスのおよびパピローマウイルス以外のウイルス様粒子もまた企図される。感染性ウイルスもまた考えられる。弱毒化したまたは生得的に非病原性のウイルスを同様のやり方で修飾し、自己抗体の産生に使用することができる。本発明に関連する使用のために特に企図されるキメラＶＬＰの例は、Ｉｎｔｅｒｖｉｒｏｌｏｇｙ、３９：１（１９９６）に記載のものであり、これは参照により本明細書に援用される。自己抗体の産生を刺激する際の使用のために企図されるキメラＶＬＰには、ＢＰＶ－１、ＨＰＶ－１、ＨＰＶ－６、ＨＰＶ－１１、ＨＰＶ１６、ＨＰＶ－１８、ＨＰＶ－３３、ＨＰＶ－４５、ＣＲＰＶ、およびＣＯＰＶがある。さらに企図されるものは、Ｂ１９パルボウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスコア粒子、Ｂ型肝炎表面抗原粒子、ＨＩＶ　ｇａｇ粒子、タバコモザイクウイルス、カウピーモザイクウイルス、酵母Ｔｙ粒子、およびＲＮＡファージである。ＳＶ４０、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペス、ロタウイルス、およびノルウォークウイルスのためのウイルス様粒子が作成されており、キメラＶＬＰを作成することができる。特に、当業者は、ＢＰＶ－１、ＢＰＶ－２、ＢＰＶ－４、ＣＲＰＶ、ＤＰＶ、ＥＰＶ、ＨＰＶ－１、ＨＰＶ－５、ＨＰＶ－６、ＨＰＶ－８、ＨＰＶ－１１、ＨＰＶ－１６、ＨＰＶ－１８、ＨＰＶ－３１、ＨＰＶ－３３およびＲｈＰＶを包含する多くのパピローマウイルスの全ゲノムの完全

10

20

30

40

50

なヌクレオチド配列を既に決定している。ところが、本発明の実施形態のキャプソマー構造体を組み立てるために使用される好ましいキャプシドタンパク質は、天然の哺乳動物宿主を有する二十面体ウイルス（群）由来のタンパク質を含んでいる。したがって、本明細書に記載の方法に関連して使用できる多くの異なった主たるおよび重要性の低い少量の外殻タンパク質をコードしているポリヌクレオチド配列は、既に既知である。

【００４８】

主たるおよび／または重要性の低い外殻タンパク質を含むＶＬＰは、本明細書に開示する方法に従って免疫原性組成物を製造するために使用できるという事が理解されるべきである。特にパピローマウイルスＬ２の希少な外殻タンパク質の場合、Ｌ２キメラは、挿入された抗原を表面に露出させることができるという事を理解すべきである。標的抗原は外面にある。本発明者等がパピローマウイルスＥ７抗体の産生に使用したＬ２／Ｅ７融合物は、ＶＬＰに組み込まれた時に、ＢＰＶ　Ｌ２の最初の１１０アミノ酸がＨＰＶ１６　Ｅ７ポリペプチド配列全体に融合している（Ｌｏｗｙ等、米国特許第５６１８５３６号。これは参照により本明細書の援用される）。この例においては、Ｅ７配列を、かつてウイルス中和エピトープに対応することが示されたＬ２の部位に融合させた（Ｒｏｄｅｎ等、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６８：７５７０（１９９４））。下記の開示では、寛容原を本発明に係る規則的集合体に結合させる、幾つかのアプローチを提供する。

【００４９】

寛容原を提示する支持体またはキャプソマー構造体を作成するためのアプローチ

上記に論じたように、一般に、寛容原をウイルス様粒子の構造体中に組み込むために二つの異なるアプローチを使用することができる。一つのアプローチでは、最初に、ウイルス外殻タンパク質配列および関心の持たれる自己ペプチド配列の両者を含むアミノ酸配列をコードしている遺伝的構造物を作成する。得られる構造物は、ハイブリッド外殻タンパク質が自己集合してキャプソマー構造体またはＶＬＰを形成した後には、自己ペプチドを外表面上に提示する単一のキメラポリペプチドをコードしている。第二のアプローチによれば、ＶＬＰの外表面上に提示された自己ペプチドを、前もって作成したＶＬＰを含む多数のサブユニットタンパク質に、直接的または間接的に連結させる。例えば、野生型パピローマウイルスＬ１タンパク質は、第二の結合剤に対する結合定数が$１０^{７}－１０^{１０}$、$１０^{４}－１０^{８}$、$１０^{１０}－１０^{１２}$、または$１０^{１２}－１０^{１６}$の範囲である第一の結合剤に結合させた組換え外殻タンパク質であってよい。第二の結合剤は自己ペプチドへの結合に適合させることができる。本発明の特に好ましい態様では、ビオチニル化された野生型ＶＬＰを最初に生成させる。これは、前もって作成したＶＬＰをビオチニル化することにより達成できる。次に、このビオチニル化ＶＬＰをアビジンまたはストレプトアビジンに連結した自己ポリペプチドと結合して、自己ペプチドが提示されている表面を有する複合体を形成させる。このようにして、多コピーの自己ペプチドをＶＬＰに間接的に結合させ、その結果、自己ペプチドが外殻タンパク質のペプチドバックボーン中に統合されないようにする。したがって、ハイブリッド外殻タンパク質ポリペプチド配列の重要部分として、または例えばビオチン結合を介して間接的に、自己ペプチドに連結したハイブリッド外殻タンパク質を含む組成物は、本発明の範囲内にあることが意図される。

【００５０】

本発明の実施形態により、十分な親和性、Ｂ細胞寛容の破壊、または疾患状態（例えば、ウイルス感染、腫瘍形成、または炎症）の阻害を達成するような形態または方法で寛容原が得られることが望ましい。天然の寛容原（すなわち、分散した分子が存在するので、少数のエピトープを保有する寛容原）は所望の応答を達成するために十分であり得る一方で、合成寛容原または多量体免疫原（例えば、多数の分子の寛容原を示す、すなわち、多数の同一のエピトープを有するＶＬＰ）は、しばしばより高い免疫応答を誘発し得る。用語「多量体（ｍｕｌｔｉｍｅｒｉｃ）」は、支持体またはキャプソマー構造体の１つを超える同一の分子の存在をいうことに留意するべきである。例えば、ＣＣＲ５またはそのフラグメントのいくつかの同一の分子は、ＶＬＰ上に提示される。用語「多量体」は、用語「多重結合化（ｍｕｌｔｉｍｅｒｉｚｅｄ）」と区別されるべきであり、これは、ハイブリ

ッド分子に結合した支持体またはキャプソマー構造体をいい、各ハイブリッド分子は、一列に結合した寛容原またはその個々のエピトープの多数のコピーを含む。例えば、それぞれの多重結合化寛容原は、分散型のリンカー（例えば、λファージリンカー）を含むか含まない無作為に反復したＣＣＲ５の２０アミノ酸長のフラグメントを含み、多数の多量体寛容原は支持体またはキャプソマー構造体に結合して多重結合／多量体免疫原を形成することができる。

【００５１】

Ｂ細胞寛容を有効に破壊する多量体免疫原（合成または天然）を、支持体またはキャプソマー構造体への寛容原の結合によって得ることができる。この目的に適切な支持体には、ポリアクリルアミドビーズ、アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、磁気ビーズ、ラテックス粒子、炭水化物集合体（例えば、オリゴ糖ベースのビーズまたは集合体）、脂質集合体（例えば、脂質膜）、タンパク質集合体またはポリマー（例えば、ポリ－Ｌ－リジンまたはポリ－Ｄ－、Ｌ－アラニン）、またはサブユニットの組織化した均整のとれた集合体を有する当該分野で公知の他の支持体が含まれるが、これらに限定されない。また、寛容原が水酸基、カルボキシ基またはアミノ基および担体の反応基を介して共有結合している無機担体（例えば、シリカゲル、ゼオライト、珪藻土またはアミノ化ガラス）を、いくつかの実施形態で使用することができる。

【００５２】

いくつかの実施形態では、寛容原を、寛容原に結合している２つの化学反応種、リガンド／レセプター相互作用、またはペプチドとの間の結合であり得るリンカーを介して支持体またはキャプソマー構造体に結合して支持体またはキャプソマー構造体への結合を可能にするか、あるいは、免疫系の細胞との寛容原の会合の自由度を高めることを可能にする。いくつかの実施形態では、例えば、支持体またはキャプソマー構造体は、疎水性非共有結合性相互作用による寛容原の一部と相互作用する疎水性表面を有する。いくつかの場合、支持体の疎水性表面は、プラスチックまたは疎水基が結合された任意の他のポリマー（ポリスチレン、ポリエチレン、またはポリビニルなど）などのポリマーである。

【００５３】

さらに、寛容原は、タンパク質およびオリゴ糖／多糖（例えば、セルロース、デンプン、グリコーゲン、キトサン、またはアミノ化セファロース）を含む支持体またはキャプソマー構造体に共有結合することができる。これら後者の実施形態では、共有結合させるために寛容原上の反応基（ヒドロキシ基またはアミノ基）を使用して支持体またはキャプソマー構造体の反応基に結合させる。実施形態はまた、寛容原と相互作用する荷電表面を有する支持体を含み得る。さらなる実施形態は、寛容原を結合させるために化学的に活性化する他の反応基を有する支持体を含む。例えば、臭化シアン活性化基質、エポキシ活性化基質、チオおよびチオプロピルゲル、ニトロフェニルクロロギ酸エステル、およびＮ－ヒドロキシスクシンイミドクロロギ酸エステル結合、またはオキシランアクリル支持体を使用する。（Ｓｉｇｍａ）。

【００５４】

他の実施形態では、ビオチンのアビジン様分子（例えば、ストレプトアビジンおよびニュートラアビジン）との相互作用を利用する。以前に示されているように、ＶＬＰをビオチン化し、寛容原／ストレプトアビジン融合タンパク質に容易に結合させることができる。キャプシドタンパク質へのより多くのリジンまたはシステインの挿入により、より多くのビオチン化が行われ、それにより、より多くの寛容原をＶＬＰの表面に付加することができる。さらに、寛容原の密度および高度に組織化された反復配列を有するＶＬＰを確立するために、部位特異的変異誘発技術の使用により、リジンまたはシステイン分子を計画的に挿入することができる。当業者が即座に認識するように、その逆（すなわち、ストレプトアビジン／キャプソマータンパク質融合およびビオチン化寛容原の使用）も行うことが出る。別の実施形態では、可動性を促進し、存在し得る任意の立体障害を克服するために、適切な長さのλリンカーを寛容原と支持体またはキャプソマー構造体との間に挿入する。最適な免疫応答を可能にする適切な長さのリンカーの同定を、本明細書中に記載の種々

のアッセイにおける種々リンカーを用いた寛容原のスクリーニングによって行うことができる。

【００５５】

１つを超える型の寛容原を有する複合支持体もまた、実施形態である。「複合支持体」は、２つまたはそれ以上の異なる寛容原を結合または固定するために使用される高分子構造であり得る。複合支持体はまた、上記で詳述のように、反応基を介して形成された疎水性相互作用および共有結合の使用によって構築される。さらに、いくつかの実施形態では、分子の可動性をより高く促進するために、かつ、立体障害を克服するために、寛容原と支持体との間に適切な長さのλリンカーなどのリンカーを挿入する。最適な免疫応答を可能にする適切な長さのリンカーの同定を、本発明の開示に詳述のアッセイにおける種々のリンカーを用いた寛容原のスクリーニングによって行うことができる。

【００５６】

本発明の他の実施形態では、それぞれ「多重結合多量体支持体」および「多重結合複合支持体」を作製するために、上記で考察した多量体および複合支持体を、多重結合寛容原に結合している。例えば、多重結合寛容原の実施形態は、分子生物学の従来の技術の使用によって結合させた寛容原をコードする２つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を有する発現構築物の作製によって得られる。発現した融合タンパク質は、多重結合因子の１つの実施形態であり、それを支持体に結合させる。多くのこのような多重結合因子を有する支持体を、多重結合多量体支持体という。寛容原の多重結合形態は、免疫応答を誘導する、ひいてはＢ細胞寛容を破壊するより良好な能力を有する因子を得る能力のための多くの適用に有利であり得る。多重結合因子を作製するタンパク質ドメインの間のリンカーまたはスペーサー（可動性λリンカー）の組込みはまた、いくつかの実施形態に有利であり得る。例えば、タンパク質と結合ドメインとの間の適切な長さのλリンカーの挿入により、分子の可動性の増加を促進し、ドメインの間の立体障害を克服する。同様に、多重結合化寛容原と支持体との間へのリンカーの挿入により、可動性の増加を促進し、支持体またはキャプソマー構造体に存在する立体障害を減少させる。最適な免疫応答を可能にするリンカーの適切な長さの同定を、本開示に詳述のアッセイにおける種々のリンカーを用いた寛容原のスクリーニングによって行うことができる。同様の様式で、リンカーを含むか含まない複合多重結合化多量体支持体を、支持体への１つを超える異なる多重結合化寛容原の結合によって構築することができる。

【００５７】

特に、自己免疫応答が望ましい自己抗原の挿入用の好ましいウイルス様粒子上の部位は、ウイルス中和エピトープである。これは、典型的には、ウイルス中和エピトープはウイルスの表面上に配置され、抗体結合に利用することができるためである。これらの特徴は、キメラウイルス様粒子の構造的背景における免疫系に対する自己抗原の提示に望ましい。乳頭腫ウイルス中和エピトープの同定法は、Ｌｕｄｍｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，　７０、４７９１、１９９７、Ｌｕｄｍｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１、３８３４、１９９７、およびＲｏｄｅｎｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１、６２４７、１９９７に記載されている。一般に、ウイルス中和エピトープの同定法は、好ましくは２つの密接に関連したＬ１タンパク質の１つと結合するモノクローナル抗体を使用し、その間の特異的なアミノ酸の相違を再類別する組換え体を系統的に作製する。あるいは、関連ウイルス（例えば、乳頭腫ウイルス）のＬ１タンパク質をコードするポリペプチド配列を整列させて、最も長さの変化するセグメントを同定することができる。これらの高度に変化する位置は、おそらく、キャプシドタンパク質の外部または内部ループであろう。外部ループは、自己免疫応答と考えられる自己抗原のポリペプチド配列の置換の候補である。したがって、日常的な実験室での手順によって容易に同定することができるウイルス中和エピトープは、本発明のＶＬＰまたはキャプソマー構造体における自己ペプチドの配置に好ましい部位である。例えば、ＢＰＶ－１上のウイルス中和エピトープ部位は、自己ペプチドの配置用の対応するＶＬＰ上の好ましい部位であろう。以下の節では、本発明の態様で使用することができる寛容原のサイズの考察を提供する。

【００５８】
支持体またはキャプソマー構造体に対する寛容原のサイズ
一般に、ウイルス外殻タンパク質構造に組込まれるか、支持体またはキャプソマー構造体に結合する抗原を示すアミノ酸の数は、抗原の特徴であり抗体の抗原結合部位に適合し得るエピトープに対応するのに十分な大きさでなければならない。一般に、抗原結合部位への結合には５～６アミノ酸の直鎖配列で十分であると認められており、少なくとも５アミノ酸の自己抗原を免疫原構造体に組み込むことが好ましい。しかし、より多数のアミノ酸の使用もまた良好な結果を得ることができることが理解される。本明細書中に示した実施例では、１６アミノ酸のマウスＣＣＲ５タンパク質をＬ１主要外殻タンパク質構造体へ組み込むことによりにより良好な結果が得られた。寛容原を示すより長いポリペプチド配列もまた、抗自己免疫反応の誘導用の免疫原として使用されるウイルス外殻構造体への取り込みが意図される。したがって、免疫原ウイルス様粒子は、少なくとも５アミノ酸長の自己ポリペプチド配列を組み込むが、寛容原の長さは２００アミノ酸長を超え、かつ全長タンパク質を含み得ることが好ましい。望ましい範囲は、５～２００アミノ酸である。すなわち、寛容原は、5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21，22，23，24，25，26，27，28，29，30，31，32，33，34，35，36，37，38，39，40，41，42，43，44，45，46，47，48，49，50，51，52，53，54，55，56，57，58，59，60，61，62，63，64，65，66，67，68，69，70，71，72，73，74，75，76，77，78，79，80，81，82，83，84，85，86，87，88，89，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99，100，101，102，103，104，105，106，107，108，109，110，111，112，113，114，115，116，117，118，119，120，121，122，123，124，125，126，127，128，129，130，131，132，133，134，135，136，137，138，139，140，141，142，143，144，145，146，147，148，149，150，151，152，153，154，155，156，157，158，159，160,160，161，162，163，164，165，166，167，168，169，170，171，172，173，174，175，176，177，178，179，180，181，182，183，184，185，186，187，188，189，190，191，192，193，194，195，196，197，198，190，191，192，193，194，195，196，197，198，199，200,アミノ酸長またはそれ以上であり得る。

【００５９】
ビオチン化ＶＬＰは、実質的に１６アミノ酸長を超えるペプチドと複合化し、免疫系に提示され得ることが意図される。全長タンパク質を示すポリペプチド配列を小さなハイブリッド外殻タンパク質構造体に組み込むこともできる。本発明者らは、以下に本発明の実施形態として示すことができる広範な種々の寛容原を記載する。

【００６０】
多数の型の寛容原を支持体またはキャプソマー構造体に提示することができる多数の寛容原 広範な種々の寛容原を用いて、本発明を実施することができる。好ましい実施形態では、寛容原は自己抗原である。好ましい自己抗原には、自己抗原を標的する抗体が有効な治療薬であると認められている抗原がふくまれる。一般には、自己抗原は、ＶＬＰに結合した自己抗原を含む組成物で免疫化される生物の自己抗原に一致する。したがって、ヒトの免疫化用に、ヒト自己ペプチド（ヒトＣＣＲ５ケモカインレセプターなど）を、ＶＬＰ構造体に組み込むことができる。この方法では、ヒトは自己抗体を産生することができる。使用することができ自己抗原の特定の例は、ＴＮＦ－αおよびＣＴＬＡ－４などの中枢自己抗原である。

【００６１】
ＴＮＦ－αは、多数のヒト疾患（慢性関節リウマチ（ＲＡ）の原理となる溶解性エフェクターとして最も注目すべきである）に関連している（Ｍａｉｎｉ ｅｔ ａｌ．、Ｉｍｍ．Ｒｅｖｉｅｗｓ、１４４、１９５、１９９５）。慢性関節リウマチは、世界人口の約１％が罹患していると考えられている複数の関節の慢性で痛みを伴う疾患である。ＲＡの症状は、薬物療法は無効である。これにより、症状よりもむしろ疾患のエフェクターを標的する別の治療ストラテジーの開発が望まれている。抗ＴＮＦ－αモノクローナル抗体治療により、ヒト臨床試験においてＲＡの客観的および主観的指標を劇的に改善した（Ｆｅｌ

ｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４、３９７、１９９６）。不運にも、この利点は一時的であることが証明されており、この効果の喪失はモノクローナル抗体に対する抗体の発生に相関していた。ＴＮＦ－αが比較的低濃度の血清で生物学的に活性である小さな可溶性タンパク質である事実とあわせて、これらの知見により、ＴＮＦ－αはワクチンを含む自己抗体用の魅力的な標的となった。さらに、この概念を試験するためのＴＮＦ－α媒介ＲＡ用の良好なマウスモデルが存在する（Ｔｈｏｒｂｅｃｋｅ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９、７３７５、１９９２）。

【００６２】
ＣＴＬＡ－４は、Ｔ細胞のＢ７が媒介する同時刺激の重要なレギュレーターであると考えられるＴ細胞の膜結合レセプターである（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、７、４４５、１９９７）。同時刺激は、有効なＣＤ８＋Ｔ細胞が媒介する細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答の発生に重要である。通常、ＣＴＬＡ－４がＢ７固定後に正または負のシグナルを伝達するように作用するかどうかは現在未解決である（Ｚｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５、６２８４、１９９８）。しかし、ＣＴＬＡ－４に対する抗体は、マウス腫瘍モデルにおける腫瘍抗原に対する反応において、ＣＴＬの産生を明確に強化する。したがって、ＣＴＬＡ－４に対する自己抗体誘導用のワクチンを使用して、腫瘍のみまたは腫瘍抗原特異的ワクチンとの組み合わせに対する免疫応答を増強することができる（Ｌｅａｃｈ ｅｔ ａｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７１、１７３４、１９９６）。特に、一過性自己免疫疾患の症状は、従来の治療に不応性の広範な散在性または手術不可能な癌被検者の受容可能な副作用であり得る。

【００６３】
他の意図される寛容原には、慢性的にヒトに感染するウイルス（Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、ＨＩＶが含まれるが、これらに限定されない）由来のウイルス抗原、ケモカインおよび新形成および血管形成に関連する分子が含まれる。本明細書中に記載の技術の使用によって、当業者は、ビオチン化ＶＬＰ上に種々の異なる寛容原（核酸、ペプチド、脂質、および炭水化物を含む）を提示させることができる。例えば、最初にビオチン化核酸をストレプトアビジンに結合させて、次に、核酸／ストレプトアビジン複合体をビオチン化ＶＬＰに結合させるサンドイッチアプローチを使用することができる。同様に、従来の化学的性質を使用して、脂質を、ビオチン、ストレプトアビジン、およびビオチン化ＶＬＰに結合させることができる。

【００６４】
ビオチン化ＶＬＰの試験中に、Ｂ細胞の小さな有機化合物の破壊能力を確立した。ビオチンは、ビタミンであり、マウスの自己寛容原である。先に記載のように、本発明者らは、ビオチン化ＶＬＰを調製し、上記のようにこの免疫原をマウスに注射した。抗ビオチン抗体の存在を、ビオチン化ＢＳＡを標的抗原として使用するＥＬＩＳＡアッセイによって同定した。ネガティブコントロールとして、非ビオチン化ＢＳＡに対する血清反応性を同定した。３匹のマウスの血清における抗ビオチン抗体の力価は、１００、１００、および１０であり、非ビオチン化ＢＳＡに対する反応性は検出されなかった。

【００６５】
上記の組成物を、Ｂ細胞寛容の研究についてのモデル系を得ることができるがヒト疾患の治療および予防用の治療および予防用の医薬品に組込まれることが好ましい、例えば、免疫系の単離細胞に結合する生物工学的ツールとして使用することができる。以下の開示は、本発明のいくつかの治療および予防の実施形態を考察している。

【００６６】
治療および予防への適用
本発明の組成物は、癌、ウイルス感染、または炎症などの疾患の予防のための予防手段または既にこれらの疾患を罹患している被験体を治療するための治療手段として被検者の治療に適切である。予防薬として本発明の薬剤で治療できるが、ほとんどの適切な被験体は

10
20
30
40
50

、Ａｂ結合に接近しやすい媒介物を有する疾患の危険性のある被検者である。
【００６７】
本発明の薬学的に活性な化合物を、生薬の従来の方法にしたがって処理して、被検者（例えば、ヒトを含む哺乳動物）への投与用の薬剤を製造することができる。これを、修飾するか修飾することなく薬学的生成物に組み込むことができる。さらに、いくつかの経路で本発明の免疫原をとどける医薬品または治療薬の製造は、本発明の態様である。
【００６８】
本発明の化合物を、従来の賦形剤（すなわち、本発明の組成物と有害に反応しない非経口、経腸（例えば、経口）、または局所投与に適切な薬学的に受容可能な有機または無機担体物質）との混合物で使用することができる。適切な薬学的に受容可能な担体には、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物（ラクトース、アミロース、またはデンプンなど）、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘稠性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。薬学的調製物を滅菌し、所望ならば、活性化合物と有害に反応しない助剤（例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝液、着色物質、香味料および／または芳香剤など）と混合することができる。
【００６９】
特定の処方物の有効量および投与法は、個々の被検者および病期ならびに当業者に公知の他の因子に基づいて変化し得る。このような化合物の治療効果および毒性を、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順（例えば、ＥＤ５０（集団の５０％に治療効果のある用量）およびＬＤ５０（集団の５０％致死量））によって同定することができる。治療効果に対する毒性の用量比は治療指数であり、ＥＤ５０／ＬＤ５０比として示すことができる。高い治療指数を示す薬学的組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトへの投薬範囲の処方に使用する。このような化合物の投薬量は、毒性がほとんどないか全くないＥＤ５０の循環濃度範囲内であることが好ましい。投薬量は、使用した投薬形態、被検者の感受性、および投与経路に依存してこの範囲内で変化する。
【００７０】
正確な投薬量は、治療を受ける被検者を考慮して、個々の医師によって選択される。十分なレベルの活性部分を得るように、または、所望の効果を維持するように、投薬量および投与を調節する。考慮することができるさらなる因子には、被検者の疾患の重症度、年齢、および体重、食事、投与時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、および治療に対する寛容／応答が含まれる。
【００７１】
投与経路には、経皮、非経口、胃腸、経気管支、および経肺胞が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与経路には、電気的または直接注射（中心静脈ラインへの直接注射、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下注射など）が含まれるが、これらに限定されない。胃腸投与経路には、摂取または直腸が含まれるが、これらに限定されない。経気管支および経肺胞投与経路には、口または鼻腔内のいずれかを介した吸入が含まれるが、これに限定されない。
【００７２】
経皮投与に適切な組成物には、皮膚に直接塗布するか保護担体（経皮デバイス（「経皮パッチ」）など）に組込んだ薬学的に受容可能な懸濁液、オイル、クリーム、および軟膏が含まれるが、これらに限定されない。適切なクリーム、軟膏などの例を、例えば、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅに見出すことができる。適切な経皮デバイスの例は、例えば、１９８９年4月４付けで、にＣｈｉｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．に付与された米国特許第４，８１８，５４０号（本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

10
20
30
40
50

【００７３】
非経口投与に適切な組成物には、薬学的に受容可能な滅菌等張液が含まれるが、これに限定されない。このような溶液には、中枢静脈への注射、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下注射用の生理食塩水およびリン酸緩衝化生理食塩水が含まれるが、これらに限定されない。
【００７４】
経気管支および経肺胞投与に適切な組成物には、吸入用の種々の型のエアゾールが含まれるが、これに限定されない。経気管支および経肺胞投与に適切なデバイスもまた実施形態である。このようなデバイスには、噴霧器および気化器が含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物の送達のために、多くの形態の現在利用可能な噴霧器および気化器を容易に適用することができる。
【００７５】
胃腸投与に適切な組成物には、注射および直腸投与用の座薬用の薬学的に受容可能な粉末、丸剤、または液体が含まれるが、これらに限定されない。使用が容易であるので、胃腸投与（特に、経口）が本発明の好ましい実施形態である。
【００７６】
本発明の薬学的実施形態の投与を含む、ヒト疾患のいくつかの治療および予防法を提供する。これらの態様では、本発明の組成物を、医薬品に組込み、必要な被検者に投与する。１つのアプローチによって、ＨＩＶ感染または別の慢性ウイルス感染に接触する危険性のある被検者またはすでにＨＩＶ感染または別の慢性ウイルスに感染している被検者を、従来の診断アッセイによって同定し、治療または予防有効量の本発明の医薬品を被検者に投与する。類似のアプローチを使用して慢性炎症性疾患治療および／または予防をすることができる。これは、必要な被験体の同定および本発明の組成物を含む医薬品の投与である。本発明の他の方法には、高力価の中和抗体を惹起するアプローチが含まれる。したがって、薬剤（例えば、本発明の組成物）を、そのＢ細胞破壊能力について同定し、その後必要な被験体に投与する。さらなる実施形態には、本発明の組成物に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の作製法が含まれる。これらの新規の抗体を、医薬品に組込み、ヒト疾患の治療および予防に必要とされる被検者に投与することができる。以下の開示はこれらのアプローチをより詳細に考察している。
【００７７】
キメラおよび結合ＶＬＰに対する抗体の調製
以下のキメラまたは結合ＶＬＰの構築後、これらの組成物を使用して抗体を作製することができる（実施例１０を参照）。キメラまたは結合ＶＬＰを認識する抗体は、多くの用途を有し、これには、生物工学的適用、治療／予防的適用、および診断的適用が含まれるが、これらに限定されない。このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Ｆａｂフラグメント、およびＦａｂ発現ライブラリーによって産生されたフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。中和抗体（すなわち、ＣＣＲ５媒介接着を阻害する抗体）は、治療に特に好ましい。
【００７８】
抗体産生のために、種々の宿主（ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む）を、キメラまたは結合ＶＬＰの注射によって免疫化することができる。宿主の種に依存して、種々のアジュバントを使用して免疫応答を増強することができる。このようなアジュバントには、フロイントアジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、および界面活性剤（例えば、リゾレシチン）、多機能性（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが含まれるが、これらに限定されない。ＢＣＧ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍは潜在的に有用なアジュバントである。しかし、ＶＬＰベースの免疫原もまた、さらなるアジュバントなしで寛容原に対する抗体の力価を増加させることができる。
【００７９】

キメラまたは複合体ＶＬＰに対するモノクローナル抗体を、継代培養細胞株によって抗体分子が産生される任意の技術を用いて調製することができる。これらには、Ｋｏｅｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ、２５６、４９５～４９７、１９７５に最初に記載のハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｓｂｏｒ ｅｔ ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ、４、７２、１９８３、Ｃｏｔｅ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８０、２０２６～２０３０、１９８３）、およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｎ．Ｙ．、ｐｐ．７７～９６、１９８５）（その全てが本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、「キメラ抗体」を作製するために開発された技術（適切な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体のスプライシング）を使用することができる。（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８１、６８５１～６８５５、１９８４、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ、３１２、６０４～６０８、１９８４、およびＴａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ、３１４、４５２～４５４、１９８５（その全てが本明細書中で参考として援用される））。あるいは、一本鎖抗体の産生について記載した技術（米国特許第４，９４６，７７８号（本明細書中で参考として援用される））を、キメラまたは結合ＶＬＰに指向する一本鎖抗体の産生に適用することができる。抗体を、Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８６、３８３３～３８３７、１９８９、およびＷｉｎｔｅｒ Ｇ．ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ Ｃ．、Ｎａｔｕｒｅ、３４９、２９３～２９９、１９９１（その全てが本明細書中で参考として援用される）に記載のようにリンパ球群におけるｉｎ ｖｉｖｏ産生の誘導によって、あるいは、組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合試薬のパネルのスクリーニングによって産生することもできる。

【００８０】

キメラまたは複合体ＶＬＰの特異的結合部位を含む抗体フラグメントを作製することもできる。例えば、このようなフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって作製することができるＦ（ａｂ’）２フラグメントおよびＦ（ａｂ’）２フラグメントのジスルフィド架橋の還元によって作製することができるＦａｂフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、所望の特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速で容易な同定を可能にするＦａｂ発現ライブラリーを構築することができる。（Ｈｕｓｅ Ｗ．Ｄ． ｅｔ ａｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５６、１２７５～１２８１、１９８９（本明細書中で参考として援用される））。

【００８１】

１つのアプローチによって、以下のようにキメラまたは結合ＶＬＰに対するモノクローナル抗体を作製することができる。簡単に述べれば、マウスを、それら由来の数μｇの選択タンパク質またはペプチドと数週間にわたり反復接種する。次いで、マウスを屠殺し、脾臓の抗体産生細胞を単離する。脾臓細胞をポリエチレングリコールの存在下でマウス骨髄腫細胞と融合させ、過剰な非融合細胞を、アミノプテリンを含む選択培地（ＨＡＴ培地）での系の増殖に追って破壊する。首尾よく融合した細胞を希釈し、希釈物のアリコートを、マイクロタイタープレートのウェルにおき、培養物の増殖を継続する。抗体産生クローンを、Ｅｎｇｖａｌｌ，Ｅ．、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、７０、４１９、１９８０（本明細書中で参考として援用される）に最初に記載の免疫アッセイ法（ＥＬＩＳＡなど）およびその派生的な方法によってウェル上澄みの液中の抗体の検出によって同定する。選択したポジティブクローンを拡大し、使用するためにそのモノクローナル抗体産物を回収することができる。モノクローナル抗体産生の詳細な手順は、Ｄａｖｉｓ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．、Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、第２１－２項に記載されている。

【００８２】

単一のタンパク質の異種エピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清を、修飾していないか、あるいは免疫原性を増強するように修飾することができる上記に由来の発現タンパク質またはペプチドでの適切な動物の免疫化によって調製することができる。有効なポリクローナル抗体は、抗原および宿主の種の両方に関連する多くの因子に影響を受ける。また、宿主動物は、接種部位および用量によって変化し、抗原の不適切な用量または過剰な用量では抗血清の力価は低い。少用量（ｎｇレベル）の抗原の多数の皮内部位での投与が最も信頼できるようである。ウサギについての有効な免疫化プロトコールを、Ｖａｉｔｕｋａｉｔｉｓ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．、３３、９８８～９９１、１９７１に見出すことができる。

【００８３】

規則的な間隔で追加免疫を行い、例えば、既知濃度の抗原に対して寒天中の二重免疫拡散によって半定量的に同定し、その抗体力価が低下し始めたときに抗血清を回収することができる。例えば、Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ，Ｏ．　ｅｔ　ａｌ．、第１９章、Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｄ．Ｗｉｅｒ編、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ、１９７３を参照のこと。抗体のプラトー濃度は、通常、０．１～０．２ｍｇ／ｍｌの血清（約１２Ｍ）の範囲である。抗原の抗血清の親和性を、例えば、Ｆｉｓｈｅｒ，Ｄ．第４２章、Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第２版、Ｒｏｓｅ　ａｎｄ　Ｆｒｉｅｄｍａｎ編、Ａｍｅｒ，Ｓｏｃ．Ｆｏｒ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．、１９８０に記載のような競合結合曲線の作成によって同定する。いずれかのプロトコールにしたがって調製した抗体調製物は、生物学的サンプル中の抗原保有物質の濃度を同定する定量的免疫アッセイに有用であり、これはまた、半定量的または定量的に使用される。さらに、本開示を通して考察されているように、キメラまたは結合ＶＬＰを使用してヒトにおける抗体産生を誘導することができる。したがって、キメラまたは結合ＶＬＰを、別のタンパク質、担体、支持体、またはアジュバントに結合させるか、またはそれと共に投与して、強力な免疫応答を誘導する医薬品またはワクチンを作製することができる。

【００８４】

以下の実施例は、キャプソマー構造体に自己会合したキメラＬ１－ＣＣＲ５タンパク質をコードするポリヌクレオチドの調製および発現に使用した手順を記載する。以下に記載の手順には、ＣＣＲ５ペプチドフラグメントをコードするアミノ酸配列を組込むためのＬ１をコードするポリヌクレオチドの修飾が含まれる。この例示的証明では、第１の細胞外ループのＣ５７Ｂ１／６（Ｂ６）マウスＣＣＲ５（ｍＣＣＲ５）（ｍＣＣＲ５）由来の１６個のコドンを、ウイルス中和エピトープ部位に対応する３つの領域ＢＰＶ－１　Ｌ１配列の１つに個別に挿入した。これらのエピトープの位置は、種々のヒト乳頭腫ウイルスのポリペプチド配列のアラインメントによって以前に予想されている。ＣＣＲ５配列を投与されたＬ１の３つの不連続領域は、Ｌｕｄｍｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０、４７９１、１９９６、Ｌｕｄｍｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．ｖｉｒｏｌ．、７１、３８３４、１９９７、Ｒｏｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７１、６２４７、１９９７に記載されている。これらの部位のアミノ酸はキャプシド表面上で発現するようであるので、ＢＰＶ－１　Ｌ１中のアナログ部位をペプチド挿入用に標的した。これにより、ＣＣＲ５ペプチド配列を含むキメラＬ１タンパク質の一部が表面に発現し、ヒト免疫系に対する有効な提示に利用することができることが確実になった。

【００８５】

実施例１は、抗原粒子に自己会合したキメラＬ１－ＣＣＲ５タンパク質の作製に使用した方法を記載する。

【００８６】

【実施例】

［実施例１］

抗原粒子に自己会合することができるキメラタンパク質の構築

３つの異なるＬ１－ＣＣＲ５キメラ（「Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ１」、「Ｌ１－ＣＣＲ５キ

メラ２」、および「Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ３」を指す）をコードするポリヌクレオチドを、本質的にＨｏ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ、７７、５１、１９８９に記載の技術にしたがった重複伸長ＰＣＲ変異誘発によって調製した。ＢＰＶ－１　Ｌ１をコードするポリヌクレオチド（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ，２９９、５５７、１９８２）を、バキュロウイルスｐＦａｓｔＢａｃ　１発現ベクター（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ、ＭＤ）の多クローニング部位の相補部位にＥｃｏＲＩ／ＫｐｎＩフラグメントとしてクローン化した。各３つのキメラのＢＰＶ－１　Ｌ１配列の一部を、Ｃ５７Ｂ１／６　ｍＣＣＲ５の第１の細胞外ループをコードする配列と置換した。ｍＣＣＲ５タンパク質由来のポリペプチド配列は、以下の配列を有する：Ｈｉｓ－Ｔｙｒ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｓｎ－Ｉｌｅ－Ｍｅｔ－Ｃｙｓ－Ｌｙｓ－Ｖａｌ（配列番号1）（Ｂｏｒｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２７１、７５５１、１９９６）。Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ1では、Ｌ1アミノ酸１３０～１３６をコードする配列を、ｍＣＣＲ５配列に置換した。Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ２では、Ｌ１アミノ酸２７５～２８５をコードする配列を、ｍＣＣＲ５配列に置換した。Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ3では、Ｌ１アミノ酸３４４～３５０をコードする配列を、ｍＣＣＲ５配列に置換した。最終的なクローンを、制限消化分析およびＰＣＲ増幅領域のヌクレオチド配列分析によって確認した。

【００８７】

キメラＬ１－ＣＣＲ５タンパク質または野生型ＢＰＶ－１　Ｌ１をコードする遺伝子を含む組換えバキュロウイルス貯蔵物を、製造者が記載のように、ＧＩＢＣＯＢＲＬバキュロウイルス系を用いて作製した。乳頭腫様粒子を、先に記載のように組換えバキュロウイルス感染Ｓｆ９細胞から精製した。（Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９、１２１８０～１２１８４、１９９２、Ｇｒｅｅｎｓｔｏｎｅ，Ｈ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５、１８００～１８０５、１９９８）。粒子調製物の一般的な形態を、ＦＰＬＣ　Ｓｕｐｅｒｏｓｅ　６ゲル濾過カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を用いた移動度アッセイによって分析した。溶出物を１ｍｌの画分に回収した。このカラムの空隙用量は８ｍｌである。以前に、野生型Ｌ１　ＶＬＰはカラムの画分９に主に溶出し、Ｌ１キャプソマーは、画分１５に溶出され、Ｌ１モノマーは画分１９～２１に溶出されることが同定されている（Ｏｋｕｎ，Ｍ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．、提出中）。カラム画分を、ウェスタンブロットによってＬ１の存在について分析した。

【００８８】

実施例２は、キメラＬ１－ＣＣＲ５タンパク質がキャプソマー構造体へ自己会合することを確認するために使用した方法を記載する。興味深いことに、下記のＬ１－ＣＣＲ５粒子は、電子顕微鏡によって、野生型Ｌ１タンパク質から形成されたＶＬＰよりいくらか小さいことが示された。

【００８９】

［実施例２］

キメラキャプソマー構造体の調製

上記の３つのＬ１－ＣＣＲ５キメラを、ＦＰＬＣ　ＳＵＰＥＲＯＳＥ　６ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）によって単離した。各１ｍｌのカラム画分を、変性条件下で１０％ポリアクリルアミドゲルを用いたウェスタンブロッティングによってＬ１の存在についてアッセイした。コントロールは、野生型Ｌ１　ＶＬＰは主にカラム画分９に溶出され、Ｌ１キャプソマーは画分１５に溶出され、Ｌ１モノマーは画分１９～２１に溶出されたことを示した。キメラ２および３の調製物由来のＬ１－ＣＣＲ５タンパク質は、主に画分１５において検出された。これらの結果は、Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ２およびＬ１－ＣＣＲ５キメラ３タンパク質が、高次構造体に会合できなかったことを示唆した。これらの結果に基づいて、本発明者らは、次の手順でＬ１－ＣＣＲ５キメラ１を選択した。精製粒子を、最初にカーボン被覆の格子に粒子を吸着させ、かつ１％酢酸ウラニルで染色し、次に、その格子を３６，０

００倍のＰｈｉｌｉｐｓ電子顕微鏡モデルＥＭ　４００ＲＴを用いて試験することによって電子顕微鏡を用いて試験した。

【００９０】

これらの手順の結果は、Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ１タンパク質が会合した粒子構造体を含むことが公知のカラム画分に溶出されたことを示した。電子顕微鏡によるキメラ１粒子の試験により、粒子は約２８ｎｍの直系を有する一方で、野生型Ｌ１　ＶＬＰは約５５ｎｍの直径を有することが明らかになった。２８ｎｍの直径は、粒子が１２個のキャプソマーからなる一方で、野生型Ｌ１タンパク質から形成されるより大きな直径の構造体は、７２個のキャプソマーからなることが示唆される。形態学的には、Ｌ１－ＣＣＲ５キメラ１粒子は、１２個の５量体キャプソマーのポリオーマウイルス主要被覆タンパク質ＶＰ１の規則的な配列からなり、高イオン強度でＶＰ１キャプソマーのｉｎ　ｖｉｔｒｏ再アセンブリの際に作製することができるポリオーマウイルス１２ＩＣＯＳＡ殻（Ｔ－１粒子）に類似した（Ｓａｌｕｎｋｅ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．、５６、８８７、１９８９）。Ｌ１－ＣＣＲ５粒子に類似のサイズの小粒子を、野生型ＢＰＶ－１　Ｌ１　ＶＬＰ調製物の微量成分として見出した。Ｌ１－ＣＣＲ５粒子が野生型ＶＬＰより小さいにもかかわらず、野生型キャプソマーが欠く野生型ＶＬＰの少なくともいくつかの特徴を保有していた。特に、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子は、マウス赤血球を凝集し、粒子に結合するがキャプソマーに結合しない、ＢＰＶ－１中和モノクローナル抗体（＃９）に対してＥＬＩＳＡ反応性を示した。（Ｒｏｄｅｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６８，７５７０、１９９４）

【００９１】

以下の実施例は、キャプソマー構造体上に整列した配列として提示されたペプチド配列がどのようにして中枢抗原に対してさえも体液性免疫応答を刺激することができるのかを例示する。以下に示すように、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子を投与されたマウスは、ｍＣＣＲ５特異的抗原の産生によって応答する。有意に、この結果は、免疫化によって、内因性細胞ＣＣＲ５に対する寛容に影響されずにペプチドにＢ細胞寛容を付与することを示した。免疫原性粒子に結合した天然のｍＣＣＲ５によって誘導された抗自己抗体は、ＣＣＲ５リガンドの結合を阻害し、ｍＣＣＲ５ペプチドを含むキメラＣＣＲ５タンパク質によってＨＩＶ－１感染が阻害される。

【００９２】

実施例３は、キメラＬ１－ＣＣＲ５粒子を抗ＣＣＲ５抗体誘導用の免疫原として使用することができることを示すために使用した方法を記載する。

【００９３】

［実施例３］

寛容破壊免疫応答の刺激

抗血清を調製するために、Ｃ５７Ｂ１／６マウスに、免疫化プロトコールにおいて、ＩＭＪＥＣＴ活性化免疫原結合キット（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）にカップリングしたｍＣＣＲ５の第１の細胞外ループを示すＬ１－ＣＣＲ５粒子、野生型ＢＰＶ－１　Ｌ１　ＶＬＰ、または合成ＣＣＲ５ペプチドのいずれかを投与した。いくつかの場合、マウスに、１％ＳＤＳの存在下での２分間のボイルによって変性させたＬ１－ＣＣＲ５粒子を投与した。マウスに、１０μｇの抗原を２週間間隔で３回皮内に摂取した。ほとんどの場合、血清サンプルを、最終追加免疫の２週間後に回収した。アジュバントを使用した場合、抗原を、最初の注射用にはフロイント完全アジュバント中で、その後の注射用にはフロイント不完全アジュバント中で調製した。血清サンプルを、ＢＰＶ－１　ＶＬＰに対するＩｇＧ抗体を検出するための定量的ＥＬＩＳＡプロトコールを用いて、ＣＣＲ５ペプチドおよび野生型ＶＬＰに対する反応性について試験した。Ｋｉｒｎｂａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．、８６、４９４、１９９４に記載の手順を用いてＥＬＩＳＡを行った。ｍＣＣＲ５の第１の細胞外ループを示す合成ペプチドを調製し、担体タンパク質としてのウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）にカップリングした。抗ＣＣＲ５特異性ＩｇＧを、５０μ

10

20

30

40

50

ｌのリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中の３００ｎｇのＢＳＡカップリングＣＣＲ５ペプチドの９６ウェル　ＩＭＭＵＬＯＮ　ＩＩマイクロタイタープレート（Ｄｙｎａｔｅｃｈ，Ｃｈａｎｔｉｌｌｙ、ＶＡ）の各ウェルに３７℃で２時間の結合することによって検出した。ＰＢＳでの３回の洗浄後、ウェルを０．５％脱脂粉乳＋１％新生ウシ血清を含む５０μｌのＰＢＳを用いて室温で２時間阻害した。阻害後、ウェルを、ＰＢＳで３回再洗浄した。マウス血清を、ＰＢＳ＋０．５％脱脂粉乳で連続希釈した。最終的なＰＢＳ洗浄物を除去後、希釈した血清サンプル（５０μｌ）をウェルに入れた。プレートを、ゆっくりと振とうさせながら室温で２．５時間インキュベートした。５回の洗浄後、０．５％ミルク－ＰＢＳで１：１０，０００に希釈した５０μｌの西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）を、ウェルに添加した。プレートを、ゆっくり撹拌しながら室温で１時間インキュベートし、その後、３回洗浄した。ＡＢＴＳペルオキシダーゼ基質（５０μｌ）をプレートに添加し、室温で４５分間インキュベートし、ＴＨＥＲＭＯ　ＭＡＸマイクロプレートリーダーを用いて、４０５ｎｍの光学密度（ＯＤ）を読み取った。バックグラウンドの２倍を超えるOD_{405}値（通常、０．１を超える）を、陽性とみなした。

【００９４】

図１Ａに示した結果は、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子を投与したマウス由来の血清サンプルが、高い抗ＣＣＲ５　ＥＬＩＳＡ力価を有することを示した。それに対して、野生型ＶＬＰを投与したコントロールマウスは、予想通りＥＬＩＳＡ反応性を示さなかった。抗ＣＣＲ５力価は、フロイントアジュバントと組み合わせた免疫原を投与した３匹の動物で3×10^{3}～3×10^{4}の範囲であり、アジュバントを含まない免疫原を投与した２匹の動物で3×10^{3}であった。アジュバントを組み合わせた変性Ｌ１－ＣＣＲ５粒子を投与したマウスは、ｍＣＣＲ５ペプチド特異的抗体の証拠を示さなかった。図１Ｂに示した結果に示されるように、変性Ｌ１－ＣＣＲ５粒子の反応性欠失は、変性物質が高力価の抗Ｌ１抗体を惹起したので、ＣＣＲ５ペプチドに制限された。これらの所見により、成体動物は、中枢自己抗原に特異的な抗体の産生能力を維持していることが明確に示された。

【００９５】

上記の結果は、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子がＣＣＲ５ペプチドに特異的な抗体を惹起することを示す一方で、抗体がその天然の形態で提示された場合、細胞関連ｍＣＣＲ５タンパク質も認識することを確証するためにさらなる試験を行った。抗ＣＣＲ５抗体が細胞表面上に発現したｍＣＣＲ５に結合することを示すために、フローサイトメトリー分析（ＦＡＣＳ）を用いて、これを行った。

【００９６】

実施例４は、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子に対して惹起した抗体が細胞表面上に発現した元のｍＣＣＲ５レセプタータンパク質に結合することを示すために使用された方法を記載する。

【００９７】

［実施例４］

キャプソマー構造体に導入された自己抗原に応答して刺激された自己抗体による未変成抗原の結合

【００９８】

貯留したマウス血清由来の全ＩｇＧをプロテインＧカラム（Ｐｉｅｒｃｅ社）でアフィニティークロマトグラフィーにより当技術における通常の技能を有する者が熟知している手順により親和精製した。ＩｇＧを含有するカラム画分を貯留し、ついでＣＥＮＴＲＩＣＯＮ－３０スピンカラム（Ａｍｉｃｏｎ社；Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）を用いて濃縮した。抗体結合検定を、組み換えマウスＣＣＲ５レセプターを発現するトランスフェクションされたヒト細胞を用いて行った。Ｌ１－ＣＣＲ５粒子に対して生成した抗体の結合はマウス細胞の初代培養を用いた場合は容易に試験することができなかったが、その理由はこれらの細胞が高レベルのＦｃγレセプターを発現し、非特異的マウスＩｇＧと相互作用したために、結合の背景レベルが高くなったからである。そこで、流動細胞光度測定法（ｆｌｏｗ　ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ）分析のために、マウスＣＣＲ５発現ベクターを一時的にＨｅＬａ

－ＭＡＧＩ細胞にＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　ＰＬＵＳトランスフェクションキット（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ社；Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）を用いてトランスフェクションすることにより発現させた。Ｂ６マウスからクローン化されたｍＣＣＲ５と、ヒトＣＣＲ５のバックグラウンドにｍＣＣＲ５の第１の細胞外ループを含むヒト－マウスＣＣＲ５キメラとを含むｐｃＤＮＡ３由来プラスミドをＫｕｈｍａｎｎらによりＪ．Ｖｉｒｏｌ．，７１：８６４２（１９９７）に記載されているように調製した。トランスフェクション後４８時間の時点で５ｍＭ　ＥＤＴＡの存在下で単層を静かに掻き取ることにより分離した。細胞を染色用バッファ（ＰＢＳ＋０．５％ＢＳＡ）中で３回洗浄した。約１０^{5}個の細胞を、染色用バッファ２５μｌにマウスＩｇＧを１μｇ加えたものに再懸濁し、ついで４５分間４℃でインキュベートした。細胞を染色用バッファで３回洗浄し、染色用バッファ２５μｌにフルオレセイン（ＦＩＴＣ）－標識化ヤギ抗マウスＩｇＧ）（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ社；Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）２５０ｎｇを加えたものに再懸濁し、３０分間４℃でインキュベートした。細胞を染色用バッファで３回洗浄し、最終的にＦＡＣＳ分析用に調製するために染色用バッファ０．５ｍｌに再懸濁した。対照として、細胞を、ＦＩＴＣ－標識化マウス抗ヒトＣＣＲ５単クローン抗体（ｍＡＢ１８２）（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社；Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）５００ｎｇを用いて製造者の提供した取り扱い仕様書に従って染色した。ＦＡＣＳＣＡＬＩＢＵＲおよびＣＥＬＬＱＵＥＳＴソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社；Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳ分析を行った。特異的結合の測定はｐｃＤＮＡ３ベクターをトランスフェクションした対照細胞の染色と比較して行った。

【００９９】

これらの手順を行った結果から、Ｌ１－ＣＣＲ５キャプソマー粒子を特異的に結合した組み換えｍＣＣＲ５レセプターの投与に応答して刺激された自己抗体がトランスフェクションされたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞の表面に発現することが示された。図２ＡはＬ１－ＣＣＲ５で免疫化されたマウス由来のＩｇＧがｍＣＣＲ５レセプターを発現したトランスフェクションされた細胞に高い親和性で特異的に結合するが、ベクター単独でトランスフェクションされた細胞には結合しないこと示している。ｍＣＣＲ５を発現する細胞は、野生型Ｌ１（図２Ｂ）により形成されたウイルス様粒子またはヒトＣＣＲ５の第２の細胞外ループに特異的な単クロン抗体（ｍＡＢ１８２）（図２Ｃ）を用いた免疫化に応答して刺激された抗体を実質的に結合しないが、これは予想どおりである。抗体の特異性についての対照として、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）に結合したｍＣＣＲ５ペプチドをマウスに投与した。これらのマウスはＥＬＩＳＡ力価がＢＳＡ－結合したものに対して１０^{5}である抗ＣＣＲ５ペプチド抗体を産生することにより応答したが、精製ＩｇＧはｍＣＣＲ５を発現する細胞に結合しなかった（図２Ｄ）。全体として、これらの結果から示されることは、Ｌ１－ＣＣＲ５キャプソマー粒子を用いた免疫化に応答して生成した抗体は、ＫＬＨ－ＣＣＲ５ペプチドに対して生成した抗体と対照的に、細胞表面に発現された未変成のｍＣＣＲ５と特異的に結合するので、真性の自己抗体として機能することである。

【０１００】

　Ｌ１－ＣＣＲ５粒子に対して生成した抗体が未変成のｍＣＣＲ５に結合する能力をさらに検査したが、これはｍＣＣＲ５を発現するトランスフェクションされたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞に結合するための１２５Ｉ－標識化ヒトＲＡＮＴＥＳケモカイン（ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ）リガンドとの競合を試験することにより行った。マウスケモカインＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳはｍＣＣＲ５に対するリガンドである。加えて、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳのヒト相同体はｍＣＣＲ５に結合可能である（Ｍｅｙｅｒら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：１４４４５（１９９６）；Ｎｉｂｂｓら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：１２４９５（１９９７））。以下の実施例に示すように、ｍＣＣＲ５発現構築物を用いたトランスフェクションから３日後、マウス血清の希釈液の不存在下または存在下に０．５ｎＭヨウ素化ＲＡＮＴＥＳを用いて細胞をインキュベートした。

【０１０１】
実施例５はＣＣＲ５レセプターに対して生成した自己抗体がレセプターに対するリガンドの結合を阻害することを示すのに用いた方法を説明するものである。
【０１０２】
［実施例５］
レセプターに特異的自己抗体がリガンドの結合を阻害
【０１０３】
ＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞を一時的にｍＣＣＲ５発現プラスミドでトランスフェクションしたが、その際Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）から購入した$CaPO_4$トランスフェクションキットを使用した。トランスフェクション後２日目に10^5個の細胞を２４穴組織培養プレートの個別のウェルに移した。次の日に細胞を冷ＰＢＳ中で２回洗浄し、ついで冷結合用バッファ（２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．２）、５ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　$CaCl_2$、０．５％（ｗｔ／ｖｏｌ）ＢＳＡ）１５０μｌに再懸濁した。細胞を４時間、４℃でインキュベートしたが、これは０．５ｎＭ^{125}Ｉ－標識化ヒトＲＡＮＴＥＳ（Ａｍｅｒｓｈａｍ社；Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ　Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ）を用いマウス血清の種々の希釈液の不存在下または存在下に行った。小さい分子を取り除くために、結合検定を行う前に、マウス血清をＭＩＣＲＯ　ＢＩＯ－ＳＰＩＮ　ＣＨＲＯＭＡＴＯＧＲＡＰＨＹ－６カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社；Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を用いて結合用バッファにバッファ交換した。対照として、５０ｎＭまたは５００ｎＭの非ヨウ素化ヒトＲＡＮＴＥＳ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）の存在下で何度か結合検定を行った。ウェルを冷結合用バッファに０．５Ｍ　ＮａＣｌを加えたもので４回洗浄して反応を停止した。１％ＳＤＳを０．５ｍｌ添加することにより細胞を溶解し、ついで溶解産物を計数用ガラス瓶に移した。結合した放射能をＢｅｃｋｍａｎ　Ｇａｍｍａ　５５００Ｂカウンタで１分間計数した。
【０１０４】
　これらの手順を行った結果から、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子に対して生成された自己抗体は細胞表面に発現されたＣＣＲ５と特異的に結合し、リガンドがレセプターに結合するのを阻害することが確認された。特に、図４に示すグラフ化された結果からわかるように、Ｌ１－ＣＣＲ５血清の１：３０希釈液は（１００倍過剰の冷ＲＡＮＴＥＳを用いた際に観察される置き換えと同様に）ヨウ素化されたヒトＲＡＮＴＥＳの約６６％を置き換え、これに対して野生型Ｌ１　ＶＬＰ血清の１：３０希釈液を用いると３７％が置き換えられた。Ｌ１－ＣＣＲ５の１：７５希釈液および１：１５０希釈液はそれぞれヨウ素化ＲＡＮＴＥＳの２５％および１７％を置き換えたが、対照血清をこれらの希釈率で用いた場合は顕著な置き換えは見られなかった。最大限に結合したヨウ素化ＲＡＮＴＥＳは血清の不存在下で結合検定することにより決定され、図３において水平の点線で示すように約２５５０ｃｐｍに相当する。ヨウ素化ＲＡＮＴＥＳの非特異的結合（約１３００ｃｐｍ）は冷（非ヨウ素化）ヒトＲＡＮＴＥＳの１０００倍過剰（５００ｎＭ）において結合検定することにより決定した。図４に示すデータは１つの実験について２つのウェルの平均値を表す。従前の研究からＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳがヒト（ｈ）ＣＣＲ５の第２の細胞外ループに結合することが示唆されたが、その理由はそれらの結合が分子のこの部分に対して単クロン抗体により阻害されるからであり、ｈＣＣＲ５のアミノ末端に特異的な抗体により結合を阻害される訳ではないからである（Ｗｕら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８６：１３７３（１９９７））。ここに述べた知見から示されるように、これら２つの部位の間に位置する、ｍＣＣＲ５の第１の細胞外ループに対する結合特異性を持つ抗体が都合よくＲＡＮＴＥＳ結合を阻害し、さらにこれらの自己抗体のインビボ形成を刺激する方法を提供している。
【０１０５】
上述の自己抗体の有用性をさらに調べるために、本発明者らは前記の実施例において観察されたリガンド結合の阻害が標的細胞のウイルス感染の阻害と相関関係を有するか否かを検討した。単クロン抗体を用いた研究によりｈＣＣＲ５の第２の細胞外ループおよびアミ

ノ末端領域が、そしてキメラレセプターを用いた研究によりＣＣＲ５の第１および第３の細胞外ループもレセプターのＨＩＶ－１との相互作用に貢献していることを示唆した（Ｗuら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１８６：１３７３（１９９７）；Ｒｕｃｋｅｒら，Ｃｅｌｌ，８７：４３７（１９９６）；Ａｔｃｈｉｓｏｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７４：１９２４（１９９６）；Ａｌｋｈａｔｉｂら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：１９７７１（１９９７）；Ｐｉｃａｒｄら，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７１：５００３（１９９７）；Ｒｏｓｓら，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７２：１９１８（１９９８））。ｍＣＣＲ５はＨＩＶ－１コーレセプターとして機能しないけれども、ヒトーマウスキメラレセプター（ＨＭＨＨ）は、ｈＣＣＲ５の背景中にｍＣＣＲ５（Ｂ６マウス配列）の第１の細胞外ループを含有しており、ヒト細胞系統において発現されるとコレセプター活性を持つ（Ｋｕｈｍａｎｎら，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７１：８６４２（１９９７））。そこで、このキメラレセプターを以下の実施例で用いて抗Ｌ１－ＣＣＲ５血清がＭ－刺激性ＨＩＶ－１感染を阻害し得るか否かを試験した。

【０１０６】

以下の実施例で示された結果は、ＨＩＶ感染の阻害に強い関連性を示しているが、その理由はＣＣＲ５発現の部分的減少でさえも臨床的に有意の効果を持ち得るからである。これが正しいのは不活性ＣＣＲ５対立遺伝子について異型接合性であるＨＩＶ－１に感染した個体ではＡＩＤＳの進行が遅いからである（Ｌｉｕら，Ｃｅｌｌ，８６：３６７（１９６６）；Ｓａｍｓｏｎら，Ｎａｔｕｒｅ、３８２：７２２（１９９６）；Ｗｉｎｋｌｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７９：３８９（１９９８））。

【０１０７】

実施例６はＬ１－ＣＣＲ５粒子に応答して生成した自己抗体がＭ－刺激性ＨＩＶ－１による標的細胞の感染を阻害することを示すために用いた方法を説明するものである。手順中キメラ性マウスーヒトＣＣＲ５レセプターが利用されたため、最初のステップは前述の抗ＣＣＲ５自己抗体がキメラレセプターを認識することを確認するステップを含んだ。

【０１０８】

［実施例６］

抗レセプター自己抗体が標的細胞のＨＩＶ感染を阻害

【０１０９】

Ｌ１－ＣＣＲ５血清から生成したＩｇＧがヒトーマウスキメラレセプターと結合することを確認するために、ＫｕｈｍａｎｎらがＪ．Ｖｉｒｏｌ．，７１：８６４２（１９９７）に記載したＨＭＨＨ発現構築物で一時的にトランスフェクションしたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞でＦＡＣＳ分析を行った。この発現構築物を受容細胞にトランスフェクションしてから２日後にＬ１－ＣＣＲ５　ＩｇＧ、野生型Ｌ１　ＶＬＰ　ＩｇＧまたは陽性対照抗ヒトＣＣＲ５単クロン抗体のいずれかで染色した。図２Ｅ－２Ｇに示す結果からわかるように、Ｌ１－ＣＣＲ５粒子だけでなく、ヒトＣＣＲ５の第２の細胞外ループに特異的な陽性対照の単クロン抗体を投与したマウス由来の血清ＩｇＧを用いて陽性の結合が得られた。しかし、予想通り、野生型Ｌ１　ＶＬＰを投与したマウス由来のＩｇＧはＨＭＨＨと結合しなかった。

【０１１０】

前述の結果に基づいて、Ｌ１－ＣＣＲ５マウス由来の血清をＨＩＶ－１のＭ－刺激性ＢａＬ株の感染を阻害する能力について試験したが、その際単一複製サイクル検定およびＨｅＬａ－ＭＡＧＩ指標細胞系統を用いた。ＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞は、ＫｉｍｐｔｏｎらによりＪ．Ｖｉｒｏｌ．，６６：２２３２（１９９２）に記載されているように、市販のＣａPO_4トランスフェクションキット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いてキメラ性ヒトーマウスＣＣＲ５発現ベクターで一時的にトランスフェクションした。トランスフェクションから２日後で、かつ感染の前日に指標細胞を２４穴プレートにウェル当たり６．５×10^4個の細胞密度で完全ＤＭＥＭ培地中に播種した。若干例の感染を、ＭＩＣＲＯ　ＢＩＯ－ＳＰＩＮ　ＣＨＲＯＭＡＴＯＧＲＡＰＨＹ－６カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いてあらかじめＰＢＳにバッファ交換した貯留マウス血

清の存在下に行った。感染に先立って、細胞を、１０μｇ／ｍｌのＤＥＡＥ－デキストランとともに血清の希釈液を加えた完全ＤＭＥＭ培地中で総体積１４０μｌで３０分間４℃でインキュベートした。インキュベーション終了後、ウイルスを各ウェルに加えて全体積を１５０μｌとした。細胞を２時間３７℃でインキュベートした後、１ｍｌの完全ＤＭＥＭ培地を各ウェルに加えた。感染から３日後に細胞をＸ－ｇａｌで染色し、感染したウェルの青い核の数を数えることにより感染用量を決定した。ウイルス侵入の阻害を、血清存在下の青い核の平均数を血清不存在下の感染中心の平均数と比較して評点した。典型的には対照（無血清）ウェルにおいて５０～７５個の青色の感染中心が存在するのに十分な感染性ビリオン（ｖｉｒｉｏｎ）をそれぞれの感染において使用した。検定はすべて二重に行った。継代接種すると、トランスフェクションしたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞の感染効率が顕著に低下したが、これはおそらくＣＤ４の発現が減少するためである。従って、感染はすべて最近解凍したＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞に行った。

【０１１１】

これらの手順を行った結果をグラフ化して図４に示したが、これらの結果から示されるように、自己ＣＣＲ５抗原に対して生成された血清抗体であり、未変成の抗原を認識することが示されかつリガンドーレセプター相互作用を阻害したものは、また標的細胞のウイルス感染をも阻害した。ＨＭＨＨ発現構築物で一時的にトランスフェクションし、Ｌ１－ＣＣＲ５血清の１：１５、１：３０および１：７５希釈液の存在下にＨＩＶ－１　ＢａＬと接触した指標細胞は感染性がそれぞれ６５％、５０％および４５％中和された。同じ希釈率で、野生型Ｌ１　ＶＬＰマウス由来の対照血清は若干の非特異的中和を示したが、１：１５希釈液では２５％、１：３０および１：７５希釈液ではそれぞれ１５％のレベルであったにすぎない。陽性対照として用いたヒトＣＣＲ５（ｍＡＢ１８２）に特異的な単クロン抗体５０μｇ／ｍｌ存在下でＨＩＶ－１　ＢａＬで感染した指標細胞は約５０％の中和を示した。このように、上述の手順に従って生産された抗ＣＣＲ５自己抗体はＨＩＶ－１による罹病性細胞の感染を効果的に阻害した。

【０１１２】

本発明者らは感染性ウイルスの整った表面抗原を模倣する状況におくことによって自己抗原に対するＢ細胞の免疫寛容を破壊する方法を示した。これを行うために、本発明者らは乳頭腫ウイルスＬ１　ＶＬＰの表面の優性なウイルス中和性エピトープを自己タンパク質由来のペプチド配列で置換した。詳しくは、本発明者らはウシ乳頭腫ウイルス１型（ＢＰＶ－１）のＬ１内の中和性エピトープと想定されるエピトープ（Ｌｕｄｍｅｒｅｒら，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７０：４７９１（１９９６））にマウスケモカインレセプターＣＣＲ５の第１の外部（ｅｘｔｅｒｎａｌ）ループに相当する、長さ１６アミノ酸のペプチド配列を遺伝子工学的技法により導入した。このキメラ性Ｌ１は、キメラ性Ｌ１－ＣＣＲ５タンパク質に対するヒトの免疫応答を刺激するための免疫原として使用し得るキャプソマーの整った配列を有する粒子内に組み込まれた。

【０１１３】

キメラ性Ｌ１－ＣＣＲ５タンパク質サブユニットからなるＶＬＰで免疫されたマウスを継続的に飼育して免疫法の長期的効果を決定した。これらの効果には自己抗体産生の任意の病理学的結果が含まれる。免疫から６ヶ月経過時に免疫化マウスの体重は対照動物の体重と同じであり、外観上健康であった。最高の抗ＣＣＲ５力価を示したマウスの剖検では自己免疫疾患の徴候はなんら見られなかった。ワクチンにより予防接種したしたマウスのＣＣＲ５抗体力価は当初は安定しているが、その後Ｌ１に対する応答に並行して徐々に下降した。これらの結果から示唆されるのは、細胞性ＣＣＲ５はキメラ性ＶＬＰに誘導されたＢ細胞のＣＣＲ５ペプチドに対する応答を活性化も免疫寛容化もしないことである。

【０１１４】

以下の実施例は中心自己抗原に向けられた自己抗体がマウス以外の哺乳動物においてどのように刺激を受けるかについて説明するものである。下記の例示において、抗アカゲサルＣＣＲ５抗体の産生を誘導する組成物および産生方法を説明する。

【０１１５】

［実施例７］
アカゲサルにおける自己免疫応答の刺激
【０１１６】
まず、アカゲサルＣＣＲ５ポリペプチド配列の一部分を含むキメラ性Ｌ１－ＣＣＲ５タンパク質をコードする組み換え発現構築物を本質的に実施例１に示す手順に従って調製した。得られた発現構築物を受容体Ｓｆ９細胞内に導入し、ここで組み換えベクターによりコードされたタンパク質が産生された。受容体細胞内で産生されたキメラ性Ｌ１－ＣＣＲ５タンパク質の自己組み込み集合体を表すキャプソマー構造体をスクロース勾配およびＣｓＣｌ勾配遠心分離により精製した。並行して行う手順として、野生型Ｌ１タンパク質からなる野生型ＶＬＰも対照用免疫原として用いるために調製、精製した。対照免疫原はＬ１－ＣＣＲ５キメラに存在するアカゲサルＣＣＲ５ポリペプチド配列を含んでいない。精製した野生型ＶＬＰまたはキメラ性Ｌ１－ＣＣＲ５は、アジュバントのキャプソマー構造体と組み合わせて、それぞれ対照および試験免疫原性組成物とする。これらの組成物を実施例３に記載するような標準的免疫化手順に従ってアカゲサルに別々に皮内注射する。一例において、２週間間隔で動物に免疫原性組成物を３回投与する。最初の免疫化を行う前の時点から２匹の動物から定期的に採取した血清サンプルからは、免疫化前はＣＣＲ５結合抗体の証拠は得られなかった。対照動物から採取した血清サンプルは野生型Ｌ１ＶＬＰ免疫原性組成物の最終回投与後数週間経過時でもＣＣＲ５結合抗体についての証拠は得られなかった。これに対して、Ｌ１－ＣＣＲ５キメラを含むキャプソマー構造体を投与した動物から採取した血清サンプルは顕著なレベルの抗ＣＣＲ５抗体を含有している（図５）。これらの結果から、Ｌ１－ＣＣＲ５キャプソマー構造体が所望の免疫原性を持つことおよびこの効果が抗原特異的であることが確認された。
【０１１７】
本発明者らは、先に、他の乳頭腫ウイルスポリペプチドをＬ２マイナーキャプシドタンパク質の融合物としてＶＬＰに添加すると、これらのウイルスペプチドに対する強い細胞媒介免疫応答と挿入されたペプチドに対する特異的抗体の産生を誘起することができることを示した（Ｇｒｅｅｎｓｔｏｎｅら，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９５：１８００（１９９８）；Ｈ．Ｌ．　Ｇｒｅｅｎｓｔｏｎｅ　Ｐｈ．Ｄ．Ｔｈｅｓｉｓ（１９９８），　Ｔｈｅ　Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，　Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，　ＭＤ）。力価の高い抗体応答とＭＨＣ　Ｉに限定されたＣＴＬ応答の双方の誘起がアジュバントの不存在下にＶＬＰを少量接種することにより可能になる。上述の知見から、ＶＬＰがウイルスのエピトープに対して強い免疫応答を誘起する能力はおそらくそれらが細胞表面と相互作用する能力および反復構造の整った配列としてエピトープを提示する能力に関係しているものと考えられる。
【０１１８】
本発明者らはウイルスタンパク質のＬ２キメラを作成することに成功した。意義深いのは、融合はすべて一緒に会合（ｃｏ－ａｓｓｅｍｂｌｙ）して粒子として効率的に回収し得る全長Ｌ１ＶＬＰにするのに適合していることである（Ｇｒｅｅｎｓｔｏｎｅら，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９５：１８００（１９９８））。Ｌ２タンパク質中の大きな挿入物は、４２ｋＤａ全長タンパク質を表すものでさえもＶＬＰの会合に適合している。Ｌ２がこの大きさの挿入物を受容する能力は、Ｌ２がＶＬＰの構造体上の集合性に寄与しているのではないため、粒子の自己会合を犠牲にすることなくかなりの変更に耐えることができるという事実に帰着する。Ｌ２がＶＬＰ中で整った構造体を有することはあり得るが、その間隔はＬ１の間隔ほど近いものではないだろう。乳頭腫ウイルスのキャプシドにおけるＬ２の位置は確定されていないけれども、本発明者らはＬ２が２０面体のキャプシドの１２個の頂点に配置されていることを示す、実験に基づく証拠を得ている。これにより、Ｌ２および任意のタンパク質は約３００オングストロームの反復距離でそこに挿入されることになる。
【０１１９】
　乳頭腫ウイルスＬ２タンパク質は外来性ポリペプチド配列の大きな挿入物を収容するこ

とができ、なおかつウイルス様粒子に導入することができるので、Ｌ２の部位に挿入された全長自己タンパク質を有するＬ１／Ｌ２キメラを調製し免疫原として使用することができる。好適な実施形態では、標的ポリペプチドをＢＰＶ　Ｌ２タンパク質の最初の１１０個のアミノ酸に融合させる。これによりキャプシド上の挿入配列はＬ１　ＶＬＰに組み込まれると外側になる。実際、この方法を用いてＴＮＦ－αに対する自己抗体の産生を刺激するための免疫原として使用できるキメラ性ＶＬＰを調製することができる。

【０１２０】

以下の２つの実施例はマウスＴＮＦ－α　ＶＬＰをＬ２キメラおよびストレプトアビジン融合物としての両方の場合について作成方法を説明するものである。このタンパク質の既知の原子構造（Ｅｃｋら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４：１７５９５（１９８９））に基づいて、Ｌ１キメラも機能的に中和性抗体が結合するエピトープを含むＴＮＦ－αペプチドを挿入することにより調製することができる。ＴＮＦ－α　ＶＬＰワクチンにより予防接種したマウス由来の血清をＥＬＩＳＡ検定においてマウスＴＮＦ－αに対する反応性について、およびインビトロにおけるＬ９２９細胞のＴＮＦ－α誘起細胞溶解の阻害について試験することができる（Ｔａｋａｓａｋｉら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：１２６６（１９９７））。ＴＮＦ－αポリペプチド配列を表すＶＬＰもまたコラーゲンＩＩ型ＲＡを有するＤＢＡ／１マウスをワクチンによる予防接種をするのに使用することができる。疾患の経過におけるこの措置の効果を標準的な脚の腫れおよび組織学的分析を用いてモニターすることができる（Ｔｈｏｒｂｅｃｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，８９：７３７５（１９９２））。

【０１２１】

実施例８は免疫原として用いるキメラ性Ｌ１／Ｌ２粒子を調製するのに使用することができる方法を説明するものである。

【０１２２】

［実施例８］

自己抗体の産生を刺激するキメラ性Ｌ１／Ｌ２粒子

【０１２３】

分子クローニングの技術において通常の技能を有する者が熟知している標準的技法を用いてＬ２－マウスＴＮＦ－αポリペプチドキメラをコードする遺伝子構築物を調製しトランスフェクションされた細胞内でキメラタンパク質として発現した。ついでこれらのキメラタンパク質をＬ１ウイルス様粒子に共組み込みしてキメラ性Ｌ１／Ｌ２　ＶＬＰとした。このＬ１／Ｌ２　ＶＬＰを精製し、アジュバントと組み合わせ、免疫化手順に従って試験動物に投与した。対照として、Ｌ２－ＴＮＦ－αキメラタンパク質および可溶性ＴＮＦ－αを単独で注射した。キメラ性Ｌ１／Ｌ２　ＶＬＰ製剤を投与したマウス由来の血清サンプルＥＬＩＳＡ検定で検出可能である抗ＴＮＦ－α抗体を含有する。これに対して、対照動物由来の血清サンプルは抗ＴＮＦ－α抗体を含有していない。この結果はキメラ性Ｌ２タンパク質を含むキメラ性Ｌ１／Ｌ２粒子が自己抗体の産生を刺激するために使用するのに有用であることを示している。

【０１２４】

実施例９は自己ポリペプチド配列が粒子を構成するタンパク質にビオチン結合を介して結合している免疫原性ウイルス様粒子を作製および使用する方法を説明するものである。この場合、あらかじめ形成されたＶＬＰをビオチン化し、ついでストレプトアビジン結合自己ペプチドと接触させる。この操作が可能なのは野生型Ｌ１　ＶＬＰが一度形成されるとまったく安定しているからである。

【０１２５】

［実施例９］

ビオチン結合を介して自己ポリペプチドを導入するウイルス様粒子

【０１２６】

精製した野生型Ｌ１　ＶＬＰをスルホーＮＨＳ－ビオチン試薬を用い、製造者の提供する取扱説明書（Ｐｉｅｒｃｅ社）に従ってビオチン化した。ビオチン化したＶＬＰを２４％

－５４％スクロース直線密度勾配で分離することにより精製して遊離ビオチンを除去した。予備的実験でＬ１　ＶＬＰが濃密にビオチン化されていることがわかった。この観察により示されるように、各Ｌ１にビオチンを結合するためには少なくとも１個の露出したリジンが存在していた。マウスＴＮＡ－αポリペプチドをストレプトアビジン融合タンパク質としてのＶＬＰに接合した。ストレプトアビジンは一般的に任意の選択されたポリペプチドをビオチン化したＶＬＰに効率的に結合するのに有用である。マウスＴＮＦ－αタンパク質由来のポリペプチド配列の配列はＳｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｈｉｓ－Ｖａｌ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｈｉｓ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ（配列番号：２）である。この配列をストレプトアビジン発現ベクターｐＴＳＡ－１８ＦへのＣ－末端融合物としてクローン化した（Ｓａｎｏ，Ｔ．ａｎｄ　Ｃａｎｔｏｒ，Ｃ．Ｒ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１７６：５７１－５７７（１９９１））。発現は０．４ｍＭ　ＩＰＴＧで誘導後３～６時間インキュベートしたＢＬ２１（ＤＥ３）（ｐＬｙｓＳ）バクテリアで行った。封入体からのタンパク質の精製はＳａｎｏ　ａｎｄ　Ｃａｎｔｏｒにより記載されたように行った（Ｓａｎｏ，Ｔ．　ａｎｄ　Ｃａｎｔｏｒ，Ｃ．Ｒ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：１４２－１４６（１９９０））。このストレプトアビジン融合タンパク質をビオチン化されたＶＬＰと３：１（重量：重量）の比率で１時間室温で反応させた。ストレプトアビジン融合物に接合した粒子を２４％－５４％スクロース直線密度勾配で遠心分離することにより精製した。ストレプトアビジン結合自己ポリペプチドを結合したまたは結合しないＶＬＰ５μｇの製剤を試験および対照マウスにそれぞれ２週間間隔で３回注射した。最終回の注射から２週間後、自己ポリペプチドを含む組成物を投与した動物から採取した血清サンプルは抗自己ポリペプチド抗体の証拠を示した。これに対して、対照動物の血清サンプルには相当する抗体は検出されなかった。

【０１２７】

マウス単クロン抗体が治療剤としておよび広範囲の基礎および応用研究用の試薬として有用であることはよく確立されている知識である。しかしながら、たいていの単クロン抗体はマウスまたはラット由来であるため、現在入手可能な抗体セットは、中心抗原が表面に露出しているマウスまたはラットのエピトープをそれらの未変成の立体配座で特異的に認識するものに欠けている。この欠失によりヒトにおける研究には限界があるが、その理由は齧歯動物は哺乳動物の生物学を研究するためのモデルであり、高度に保存されてきたタンパク質のアミノ酸配列は典型的には進化を通じて保存されている重要な機能を有するからである。そこで、本明細書に開示の方法を用いて未変成の立体配座の自己抗体に対するＢ細胞の応答を刺激することが可能である。しかるのち、所望の結合特異性を有する単クロン抗体を産生するハイブリドーマを調製しスクリーニングすることが可能である。詳しくは、ＴＮＦ－αに対する多クロン抗体を生成するのにもっとも有効なＴＮＦ－α　ＶＬＰを用いてマウスＴＮＦ－αを特異的に認識し、機能的に不活性化する単クロン抗体を生成するようにすることが可能である。標準脾臓細胞／ミエローマ融合方法を用いて単クロン抗体産生細胞を創成する（Ｇａｌｆｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２６６：５５０（１９７７））。

【０１２８】

実施例１０はＴＮＦ－αに対するマウス単クロン抗体を製造するのに使用できる方法を簡単に説明するものである。

【０１２９】

［実施例１０］

モノクローナル抗体の製造

まず、上述の方法に従って調製した表面にマウスＴＮＦ－αポリペプチドを露出したウイルス様粒子でマウスを免疫化する。ＥＬＩＳＡ検定を用いてマウス由来の血清が未変成ＴＮＦ－αに特異的な抗体を含有することを確認する。これらのマウスを殺し、脾臓細胞を採取し非分泌性ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマのコレクションを作成する。これらのハイブリドーマを当技術における通常の技能を有する者が熟知している方法に

よりスクリーニングして、未変成ＴＮＦ－αに対する結合特異性を有する抗体を分泌する細胞を同定する。ついで有効量の抗ＴＮＦ－α抗体を精製する。
【０１３０】
［実施例１１］
サブドミナントウイルス中和性エピトープに対する抗体の応答の向上
乳頭腫ウイルスＬ１およびＬ１／Ｌ２　ＶＬＰをワクチン接種すると高力価（１００，０００より大）であるが型にのみ特異的な中和性抗血清を生成することができる（Ｋｉｍｂａｕｅｒ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，８９：１２１８０－４（１９９２）；Ｒｏｄｅｎ，Ｒら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ，７０：５８５７－８３（１９９６））これに対して、Ｌ２単独で、若しくはその砕片は低力価（１０００より小）の中和性抗血清しか引き出さないが、それらは乳頭腫ウイルス型のうち交差中和性血清である場合がある（Ｒｏｄｅｎ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏ．，６８：７５７０－４（１９９４）；Ｋａｗａｎａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７３：６１８８－９０（１９９９）；Ｒｏｄｅｎ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｂｏｏｋ，１７ｔｈ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ　Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ，ｐ．６１（１９９９））。交差中和性Ｌ２抗体の力価を向上させるために、Ｌ２ペプチドをＶＬＰの表面に密な間隔の配列にする。たとえば、ＨＰＶ１６　Ｌ２のアミノ酸１０８～１２０を含むペプチドを遺伝的にストレプトアビジンのＣ末端に融合し、この融合タンパク質を実施例９に概略を説明したように製造する。ストレプトアビジン－Ｌ２融合タンパク質をビオチン化ＶＬＰと反応させ、接合されたＶＬＰを実施例９に概略を説明したように精製した。ストレプトアビジン－Ｌ２接合ＶＬＰでワクチン予防接種した哺乳動物由来の抗血清を、先に説明したインビトロ中和検定法（Ｒｏｄｅｎ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６８：７５７０－４（１９９４）；Ｒｏｄｅｎ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｂｏｏｋ，１７ｔｈ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ　Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ，ｐ．６１（１９９９））を用いて、乳頭腫ウイルス疑似ビリオンを交差中和する抗体について試験する。高力価の交差中和性抗体を検出する。
【０１３１】
本発明を実施形態および実施例を参照して説明したが、本発明の精神を逸脱することなく種々の変更を加えることができることは理解されたい。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。本明細書に文献はすべて明示的に参考して本明細書に援用される。
【図面の簡単な説明】
【図１】　図１Ａおよび１ＢはＥＬＩＳＡ検定における血清抗体反応性を示す折れ線グラフである。図１Ａは、ＢＳＡ結合ＣＣＲ５ペプチドに対するＩｇＧ抗体の反応性を示している。図１Ｂは、ＢＰＶ－１　ＶＬＰに対するＩｇＧ抗体の反応性を示している。記号は、フロイントアジュバント存在下でのＬ１－ＣＣＲ５粒子（□）、変性Ｌ１－ＣＣＲ５粒子（◇）、またはＢＰＶ－１　ＶＬＰ（△）、またはアジュバント不在下でのＬ１－ＣＣＲ５粒子（○）を接種したマウス由来の血清を使用した結果を示す。
【図２】　図２Ａ－２Ｇは、一時的にトランスフェクトしたＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞に対する抗体結合のフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。ＣＣＲ５　ＤＮＡをコードしている組み立て物（太い実線）、またはバックグラウンド染色のための対照としてベクターのみ（影を付したヒストグラム）を、染色の２日前に細胞中にトランスフェクトした。（２Ａ－２Ｄ）。マウスＣＣＲ５またはベクターＤＮＡでトランスフェクトした細胞。（２Ｅ－２Ｇ）。ヒト／マウスＣＣＲ５キメラ（ＨＭＨＨ）またはベクターＤＮＡでトランスフェクトした細胞。細胞を、Ｌ１－ＣＣＲ５で免疫したマウス由来の精製ＩｇＧ（２Ａおよび２Ｅ）、ＢＰＶ－１　ＶＬＰで免疫したマウス由来の精製ＩｇＧ（２Ｂおよび２Ｆ）、またはＫＬＨ結合ＣＣＲ５ペプチドで免疫したマウス由来の精製ＩｇＧ（２Ｄ）と共にインキュベートした。対照として、細胞はヒトＣＣＲ５の第２ＥＣループに対する蛍光標識したモノクローナル抗体で染色した（２Ｃおよび２Ｆ）。
【図３】　図３は、血清によるヨウ素化ヒトランテス（ＲＡＮＴＥＳ）の置換を示す棒グ

ラフである。ＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞をｍＣＣＲ５で一時的にトランスフェクトした。トランスフェクトの３日後、細胞を０．５ｎＭヨウ素化ＲＡＮＴＥＳと共にマウス血清の希釈液の不在下または存在下でインキュベートした。血清不在下での結合について検定することにより、最大結合したヨウ素化ＲＡＮＴＥＳを決定したが、これはおよそ２５５０ｃｐｍに相当する（点線で示す）。ヨウ素化ＲＡＮＴＥＳの非特異結合（およそ１３００ｃｐｍ）を、１０００倍過剰（５００ｎＭ）のコールド（非ヨウ素化）ヒトＲＡＮＴＥＳ中での結合について検定することにより、決定した。データは、一つの実験からの２個のウェルの平均値を表す。この検定は、再現性を確実とするため、２回反復した。

【図４】　図４は、Ｌ１－ＣＣＲ５血清、ＢＰＶ－１　ＶＬＰ血清、またはヒトＣＣＲ５の第２ＥＣループに対するモノクローナル抗体（ｍＡＢ１８２）の希釈液を用いたＨＩＶ－１　ＢａＬ感染の阻害を示す折れ線グラフである。血清は３匹の動物からプールした。感染した細胞の核が青色に染まるＨＩＶ－１のインディケーターセルラインである、ＨｅＬａ－ＭＡＧＩ細胞を、ヒトＣＣＲ５遺伝子のバックグラウンド中にマウスＣＣＲ５の第一のＥＣループを含んでいる、ヒト－マウスＣＣＲ５キメラ（ＨＭＨＨ）で一時的にトランスフェ
クトした。トランスフェクトの３日後、細胞をプールしたマウス血清の希釈液または抗体と共に、細胞を４℃で３０分間インキュベートした。次いで細胞をＭ親和性単離物ＨＩＶ－１　ＢａＬでチャレンジした。感染の３日後、核ウェル中の青色の細胞数を数えることによって、感染した細胞を採点した。血清存在下における青色の（感染した）核の数を血清不在下における青色の核の数と比較することにより、ＨＩＶ－１　ＢａＬ感染の阻害を決定した。データは、一つの実験からの２個のウェルの平均値を表す。再現性を確実とするため、この検定は少なくとも２回反復したが、同様の結果であった。（□）Ｌ１－ＣＣＲ５を接種したマウス、（○）ＢＰＶ－１　ＶＬＰを接種したマウスからの血清、または（△）ｍＡＢ１８２。

【図５】　図５は、ＥＬＩＳＡ検定における霊長類血清抗体の反応性を示す折れ線グラフである。記号は、アジュバントと共にＬ１－ＣＣＲ５粒子（□）を、またはアジュバント不在下に野生型ＢＰＶ－１　ＶＬＰ（◇）を接種したマカーク由来の血清を用いた結果を表している。

【図６】　図６は、ビオチニル化および非ビオチニル化ＶＬＰに対するストレプトアビジンの結合を示す折れ線グラフである。記号は、（□）野生型ストレプトアビジン（ＳＡ）と複合体ビオチニル化ＶＬＰ、（○）ＳＡ－ＴＮＦ－αと複合体ビオチニル化ＶＬＰ、（■）野生型ＳＡと複合体非ビオチニル化ＶＬＰ、および（●）ＳＡ－ＴＮＦ－αと複合体非ビオチニル化ＶＬＰを表す。

【図７】　図７は、ＴＮＦ－α細胞毒性検定の結果を示す棒グラフである。ビオチニル化ＶＬＰと結合させたストレプトアビジン－ＴＮＦ－α融合タンパク質（ＳＡ－ＴＮＦ－α）を接種したマウス由来の血清を、ＴＮＦ－αの存在下でＴＮＦ－α感受性細胞セルライン（Ｌ９２９）と共にインキュベートした。ビオチニル化ＶＬＰと結合させたストレプトアビジンを接種したマウス由来の血清を対照として使用した。細胞の能力。ＳＡ－ＴＮＦ－αを接種したマウス（例えば５％濃度）由来の血清は、バックグラウンドレベルと比較した時、生存細胞の数において３倍の増加を示した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> The Government of the United States of America, as represented by the
      Secretary, Department of Health and Human Services, Office of Technology
      Transfer
      Schiller, John
      Chackerian, Bryce
      Lowy, Douglas

<120> VIRUS-LIKE PARTICLES FOR THE INDUCTION
  OF AUTOANTIBODIES

<130> NIH152.001VPC

<150> 60/105,132
<151> 1998-10-21

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1
His Tyr Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ile Met Cys Lys Val
 1               5                  10                  15

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn
 1               5                  10                  15
His Gln Val Glu
            20
```

10

20

【図１】

【図２】

【図３】

【図４】

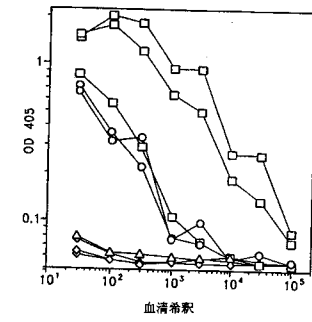
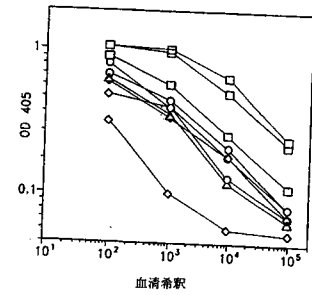
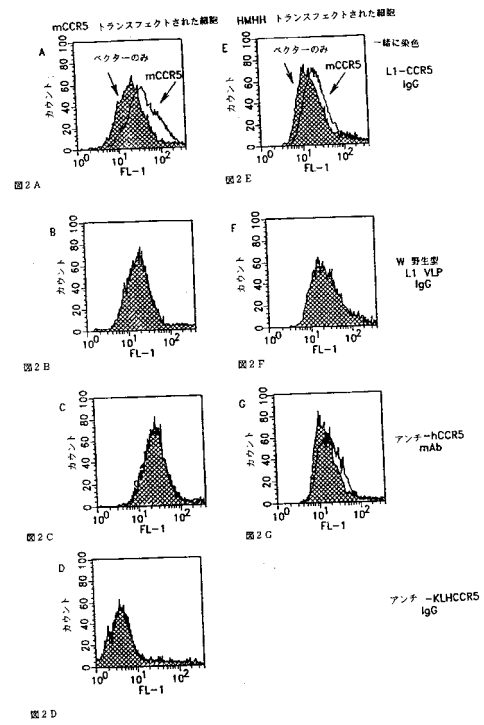
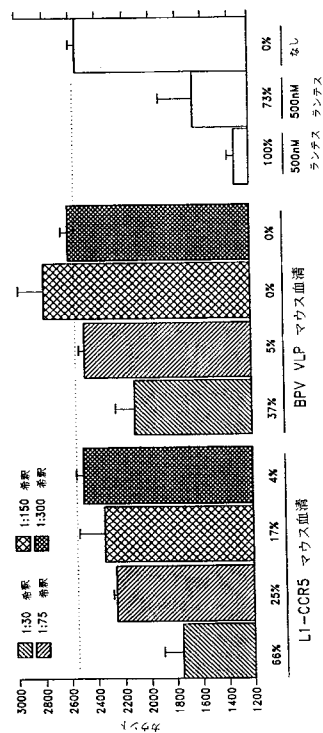
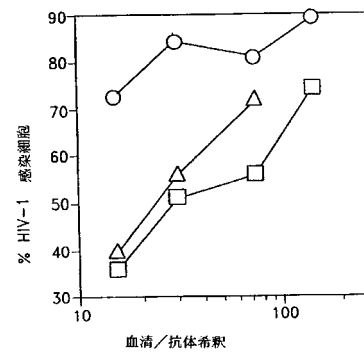
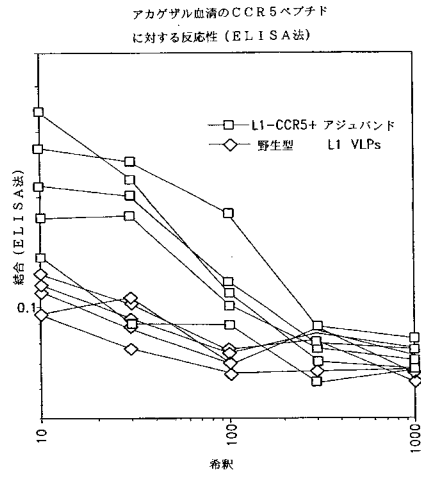
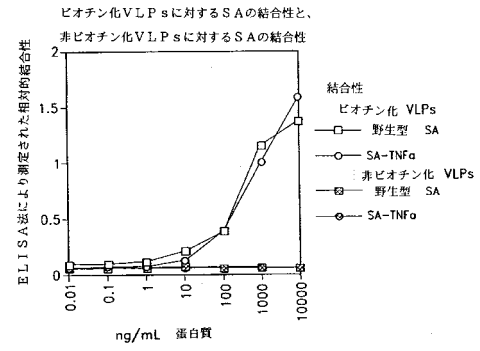
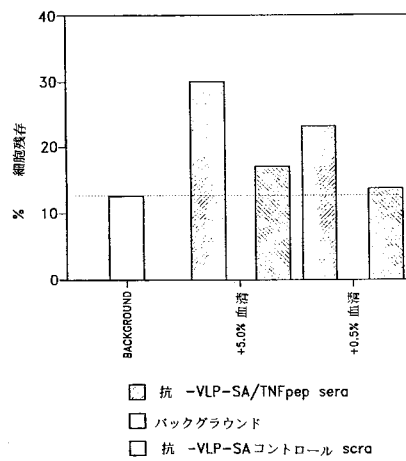
【図５】

アカゲザル血清のＣＣＲ５ペプチド
に対する反応性（ＥＬＩＳＡ法）
L1-CCR5+ アジュバンド
野生型 L1 VLPs
結合（ＥＬＩＳＡ法）
0.1
10
100
1000
希釈

【図６】

ビオチン化ＶＬＰｓに対するＳＡの結合性と、
非ビオチン化ＶＬＰｓに対するＳＡの結合性
ＥＬＩＳＡ法により測定された相対的結合性
結合性
ビオチン化 VLPs
野生型 SA
SA-TNFα
非ビオチン化 VLPs
野生型 SA
SA-TNFα
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
ng/mL 蛋白質

【図７】

% 細胞残存
40
30
20
10
0
BACKGROUND
+5.0% 血清
+0.5% 血清
抗 -VLP-SA/TNFpep sera
バックグラウンド
抗 -VLP-SAコントロール sera

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ａ６１Ｐ 31/18 (2006.01) Ａ６１Ｐ 31/12
Ｃ０７Ｋ 14/005 (2006.01) Ａ６１Ｐ 31/18
Ｃ０７Ｋ 19/00 (2006.01) Ｃ０７Ｋ 14/005
Ｃ１２Ｐ 21/08 (2006.01) Ｃ０７Ｋ 19/00
Ｃ１２Ｐ 21/08

(74)代理人 100098268
弁理士 永田 豊
(74)代理人 100089026
弁理士 木村 高明
(72)発明者 シラー，ジョン ティー.
アメリカ合衆国 メリーランド ２０９０２ シルバー スプリング メープル ビュー ドライブ １１３０６
(72)発明者 チャッケエリアン，ブライス
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８１５ シェビー チェイス フェアファックス コート ２ アパートメント １
(72)発明者 ロウイ，ダグラス アール.
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８７９ ベセスダ サウス チェルシー レーン ４７０９

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表２００１－５２５４２２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09